



Instituto Superior de  
Engenharia de Coimbra

Departamento  
de Engenharia Química e Biológica

---

# **Produção e caracterização de compostos bioactivos utilizando fungos endófitos**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em  
Processos Químicos e Biológicos

**Autor**

**Ana Sofia Malaquias Vinhas Marques Pereira**

**Orientador**

**Doutora Ana Cristina Araújo Veloso**

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

**Orientador**

**Doutora Susana Maria Almeida Cardoso**

Escola Superior Agrária de Coimbra

**Orientador**

**Doutora Paula Cristina Santos Baptista**

Instituto Politécnico de Bragança

**Orientador**

**Doutor António Manuel Coelho Lino Peres**

Instituto Politécnico de Bragança

**Coimbra, Dezembro, 2013**



***Nada se obtém sem esforço...  
e tudo se pode conseguir com ele.***  
*(Ralph Waldo Emerson)*



## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Veloso, por todo o apoio prestado, pelas suas orientações e pela sua dedicação, sem os quais não seria possível a execução desta tese.

Agradeço igualmente pelo apoio incondicional, à Professora Doutora Susana Cardoso, à Professora Doutora Paula Baptista e ao Professor Doutor António Peres; os quais contribuíram de forma a concretizar este trabalho.

Tenho a agradecer também às pessoas mais importantes da minha vida, a minha família e os meus amigos, os quais sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, tendo tido demasiada paciência para comigo nos momentos mais desgastantes.

Finalmente agradeço a todos, que directa ou indirectamente contribuíram para que o término de mais uma etapa fosse possível.



## RESUMO

O potencial biotecnológico dos fungos endófitos é actualmente reconhecido, contudo a sua utilização à escala industrial é ainda muito limitada. Isso deve-se, sobretudo ao facto do seu crescimento e composição de metabolitos formados ser dependente e variar de acordo com as condições de crescimento e da influência e interacções com a sua planta hospedeira. É fundamental, por isso, que se criem estratégias e condições simples, mas eficazes, que possibilitem o cultivo destes fungos e consequentemente a produção de compostos biologicamente activos. É importante a par de estratégias de isolamento e caracterização de novas espécies de microrganismos endofíticos sejam também optimizadas condições de crescimento e produção dos seus metabolitos e posteriormente a sua purificação e caracterização.

O trabalho experimental teve como principal objectivo optimizar as condições de crescimento e de formação de produtos com actividade antimicrobiana do fungo endófito *Fusarium oxysporum* isolado da oliveira. As condições estudadas e variadas foram a concentração inicial de glucose (1, 2 e 3%), pH (5,5; 6,5 e 7,5), temperatura (20, 25 e 30 °C) e agitação (80, 160 e 240 rpm).

Verificou-se que as condições que permitiram um maior crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* foram 25 °C, 30 g/L de glucose inicial, 240 rpm e pH 5,5. No entanto, não se verificou uma diferença significativa no crescimento do fungo relativamente à temperatura de 30 °C, à concentração inicial de glucose de 20 g/L, a uma agitação de 160 rpm e ao pH 7,5.

A formação de compostos com actividade antibacteriana foi favorecida quando as condições de fermentação foram 25 °C, 10 g/L de glucose inicial, uma agitação de 80 rpm e um pH inicial de 7,5. Contudo, a concentração de compostos com poder antibacteriano presentes nos extractos fúngicos foi muito reduzida, dificultando a sua purificação e caracterização.

Os resultados obtidos parecem indicar que se deveria utilizar condições de fermentação diferentes em termos de agitação e concentração inicial de glucose, quando se pretende optimizar o crescimento e a formação de compostos bioactivos. Contudo, será necessário a realização de mais experiências para se conseguir estipular as condições óptimas e um crescimento mais homogéneo dos fungos de fermentação para fermentação.

**Palavras-chave:** fungos endófitos, *Fusarium oxysporum*, metabolitos secundários, fermentação submersa, actividade antimicrobiana, *E. coli*, *S. aureus*





## ABSTRACT

The biotechnological potential of endophytes fungi is now recognized, however its use on an industrial scale is still very limited. This is due mainly because of their growth and composition of the metabolites formed that is dependent on, and vary with growth conditions and influence and interactions with the host plant. It is vital, therefore, that simple design strategies and conditions, but effective, enabling the cultivation of these fungi and consequently the production of biologically active compounds. It is important to pair of isolation strategies and characterizations of new species of endophytic microorganisms are also optimized growth conditions and production of metabolites and its subsequent purification and characterization.

The experimental work was to aim to optimize the conditions for growth and product formation with antimicrobial activity of endophyte fungus *Fusarium oxysporum* isolated from olive. The various conditions were studied and the initial concentration of glucose (1, 2 and 3%), pH (5.5; 6.5 and 7.5), temperature (20, 25 and 30 °C) and agitation (80, 160 and 240 rpm).

It was found that the conditions permitting further growth of the fungus *Fusarium oxysporum* were 25 °C, 30 g / L initial glucose, pH 5.5 and 240 rpm. However, there was a significant difference in relation to fungus growth temperature of 30 °C, the initial glucose concentration of 20 g / L, at 160 rpm stirring and pH 7.5.

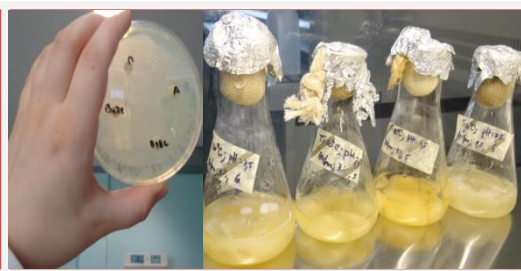
The formation of compounds with antibacterial activity was enhanced when fermentation conditions were 25 °C, 10 g / L initial glucose, agitation 80 rpm and an initial pH of 7.5. However, the concentration of compounds with antibacterial power fungal extracts were present in very small amount, hindering the purification and characterization.

The results seem to indicate that one should use different fermentation conditions in terms of agitation and initial concentration of glucose, when you want to optimize growth and the formation of bioactive compounds, however, will be necessary to conduct more experiments to achieve stipulate the optimal conditions and a more homogeneous growth of fungi fermentation to fermentation.

**Keywords:** endophytic fungi, *Fusarium oxysporum*, secondary metabolites, submerged fermentation, antimicrobial activity, *E. coli*, *S. aureus*



# Índice





## Índice

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.1. Contexto e motivação .....	3
1.2. Objectivos e metodologias .....	5
1.3. Organização da tese .....	6
2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS ENDÓFITOS.....	9
2.1. Fungos Endofíticos: produtores de metabolitos bioactivos .....	9
2.1.1. <i>Relação entre o fungo endofítico e a planta hospedeira</i> .....	10
2.1.2. <i>Isolamento e identificação de fungos endofíticos</i> .....	11
2.2. Bioprospecção de metabolitos bioactivos em fungos endofíticos .....	12
2.3. Condições de Crescimento de fungos e optimização da produção de metabolitos.....	15
2.4. Problemas e desafios na utilização industrial de fungos endofíticos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1. Material.....	21
3.1.1. <i>Microrganismos e Reagentes</i> .....	21
3.1.2. <i>Equipamento</i> .....	22
3.2. Métodos.....	23
3.2.1. <i>Preparação do inóculo</i> .....	23
3.2.2. <i>Fermentação</i> .....	24
3.2.3. <i>Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos fúngicos</i> .....	29
4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO .....	33
5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO .....	49
5.1 Conclusões gerais.....	49
5.2 Sugestões para trabalho futuro.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7. ANEXOS .....	61

## Índice de figuras

Figura 1: Fungos endófitos de oliveira.	3
Figura 2: Fungos endófitos em meio PDA.	4
Figura 3: Esquema do estabelecimento de relações de simbiose ou parasitas entre fungo endofítico - planta hospedeira (adaptado de Schulz e Boyle, 2005). A ocorrência de equilíbrio entre a resposta de defesa da planta e a virulência do fungo resulta numa interacção de simbiose. Na ausência de equilíbrio a interacção é parasita ocorrendo doença.	11
Figura 4: <i>Penicillium commune</i> de planta de oliveira em meio PDA.	12
Figura 5: Crescimento de fungos endófitos por fermentação submersa.	16
Figura 6: Fungos endófitos PAL321.FAI e PAI21.RZ isolados da oliveira, na Escola Superior Agrária de Bragança	21
Figura 7: Remoção dos esporos com solução aquosa de Tween 80.	23
Figura 8: Contagem de esporos ao microscópio com câmara de <i>Neubauer</i> a) vista ao microscópio, 40x, b) desenho de câmara de <i>Neubauer</i> .	24
Figura 9: Aspecto de uma fermentação submersa do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> , após 28 dias de crescimento.	24
Figura 10: Fermentação submersa de fungo endófito, <i>Fusarium oxysporum</i> .	26
Figura 11: Montagem de sistema de filtração a vácuo utilizada na quantificação da concentração de biomassa.	27
Figura 12: Biomassa a) antes e b) após secagem.	27
Figura 13: Esquema de preparação das soluções padrão utilizadas na determinação da recta de calibração.	28
Figura 14: Amostras da experiência C com adição de DNS, após aquecimento a 100 °C.	28
Figura 15: Recta de calibração da glucose pelo método de DNS.	29
Figura 16: Método de difusão em Agar para avaliar a capacidade antibacteriana dos extratos fúngicos.	30
Figura 17: Evaporador rotativo.	30
Figura 18: Variação da concentração de biomassa e de glucose e variação do pH em três fermentações a 25°C e 160 rpm.	34
Figura 19: Antibiógramas das fermentações, a) B; b) C e c) D, com microrganismos teste <i>E.coli</i> e <i>S. aureus</i> .	35
Figura 20: Antibiógramas das experiências do desenho experimental, com microrganismos teste <i>E.coli</i> e <i>S. aureus</i> .	37
Figura 21: Análise gráfica das interacções estatisticamente significativas entre os efeitos principais (pH e concentração inicial de glucose) para a biomassa e actividades antibacterianas relativamente à <i>E. coli</i> e ao <i>S. aureus</i> .	43
Figura 22: Amostras recolhidas ao longo do processo fermentativo no desenho experimental.	44

## Índice de tabelas

Tabela 1: Fungos endofíticos e seus metabolitos com atividade antimicrobiana (adaptado de Yu et al., 2010; Radic e Strukelj, 2012).	13
Tabela 2: Condições de fermentação de fungos endofíticos e metabolitos formados.	16
Tabela 3: Composição do meio de cultura MMN.	22
Tabela 4: Condições ambientais variadas no desenho experimental.	25
Tabela 5: Condições ambientais variadas no desenho experimental a 25°C.	26
Tabela 6: Valores finais médios de concentração de biomassa, glucose, pH e halos de inibição das fermentações preliminares B, C e D.	35
Tabela 7: Condições iniciais de fermentação para o desenho experimental e respectivos valores finais médios.	36
Tabela 8: Valores de prova (P) para factores individuais e interacções.	38
Tabela 9: ANOVA a 2 factores com interacção: avaliação da concentração de biomassa final do fungo endofítico e actividade antibacteriana relativamente à <i>E. coli</i> e ao <i>S. aureus</i> .	42
Tabela 10: Valores obtidos no decorrer da experiência A.	61
Tabela 11: Valores obtidos no decorrer da experiência B.	63
Tabela 12: Valores obtidos no decorrer da experiência C.	65
Tabela 13: Valores obtidos no decorrer da experiência D.	67
Tabela 14: Resultados referentes à experiência D30.2 e D30.3.	69
Tabela 15: Resultados referentes à experiência D30.4 e D30.5.	70
Tabela 16: Resultados referentes à experiência D30.6 e D30.7.	71
Tabela 17: Resultados referentes à experiência D30.8 e D20.1.	72
Tabela 18: Resultados referentes à experiência D20.2 e D20.3.	73
Tabela 19: Resultados referentes à experiência D20.4 e D20.5.	74
Tabela 20: Resultados referentes à experiência D20.6 e D20.7.	75
Tabela 21: Resultados referentes à experiência D20.8 e D25.4.	76
Tabela 22: Resultados referentes à experiência D25.1 e D25.3.	77

## SIMBOLOGIA e ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

% – Percentagem

μL - Microlitro

μg – Micrograma

σ – desvio-padrão

Abs - Absorvância

ADN - ácido desoxirribonucleico

AR – Açúcares redutores

$\overline{d_{halo\ inibição}}$  – média do diâmetro de halo de inibição

DNS – ácido dinitrosalicílico

*E. coli* – *Escherichia coli*

g – grama

L – Litro

mbar – Milibar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – milímetro

MMN – *Modified Melin-Norkrans*

nm – Nanómetro

P – Valores de prova

PDA – Potato Dextrose Agar

PDB – Potato Dextrose Broth

rARN – ácido ribonucleico ribossomal

rpm – Rotações por minuto

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

X – Concentração de biomassa



# Capítulo 1

## Introdução geral





## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Contexto e motivação

Actualmente, a pesquisa de produtos naturais bioactivos tem ganho um interesse crescente devido à sua grande diversidade estrutural, ao baixo custo de produção e ao múltiplo uso de compostos bioactivos no tratamento de doenças. Essa pesquisa tem sido dirigida para as plantas medicinais, nomeadamente para microrganismos que estabelecem com elas associação mutualista, visto que essas plantas têm sido tradicionalmente utilizadas para tratar sintomas de várias doenças.

A pesquisa dos microrganismos em plantas medicinais tem sido alvo de intensos estudos nos últimos anos por se acreditar que algumas propriedades terapêuticas atribuídas a essas plantas possam estar relacionadas com a produção de metabolitos secundários desses microrganismos. Recentemente, muitas descobertas têm sido realizadas através do isolamento de uma classe especial de microrganismos, maioritariamente fungos mas também bactérias e que, são comumente designados por endófitos ou endofíticos. Com esses estudos tem sido demonstrado o potencial natural desses microrganismos para produzirem vários metabolitos bioactivos que podem, directa ou indirectamente ser utilizados como agentes terapêuticos contra uma infinidade de doenças (Kusari e Spiteller, 2012).

Os endofíticos são microrganismos que infectam internamente tecidos vegetais vivos, como folhas, ramos, raízes, frutos, sementes e flores, sem causarem sintomas aparentes de doença, e vivem em associação mutualista com as plantas durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele (Hyde e Soyong, 2008). O termo “endofítico” (do grego *Endon* – dentro e *Phyton* – planta) foi utilizado pela primeira vez por *Bary* (1866). Os endofíticos mais frequentes, como já referido, são fungos. (Figura 1)

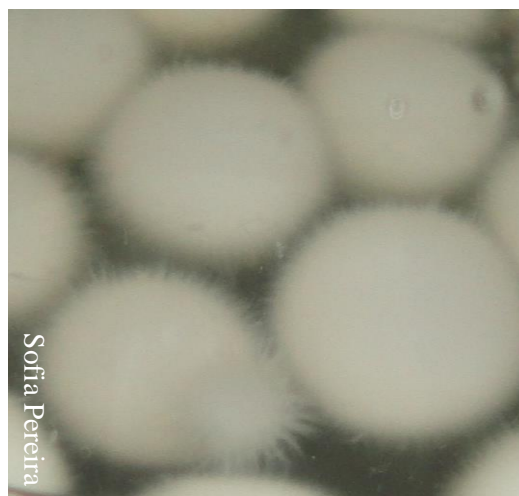


Figura 1: Fungos endófitos de oliveira.

Os fungos endofíticos são ubíquos tendo sido observados em todas as espécies de plantas estudadas até ao momento, desde herbáceas a lenhosas, e em todas as regiões e *habitats* amostrados ( (Arnold A. E., 2007); (Finlay, 2007); (Jalgaonwala, Mohite, & Mahajan, 2011)). A maioria das espécies fúngicas endofíticas pertencem ao filo Ascomycota (Arnold A. E., 2007). No entanto, espécies pertencentes aos fillos Basidiomycota e Fungos mitospóricos foram também identificadas ( (Kogel, Franken, & Hüchelhoven, 2006); (Rodriguez, White Jr, Arnold, & Redman, 2009).

A bioprospecção de fungos endofíticos tem possibilitado a exploração do seu potencial como produtores de compostos utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentar e agrícola. Até ao momento foram já descritos mais de 20000 novos compostos naturais bioactivos obtidos por fungos endofíticos sendo que 51% destes compostos apresentam estruturas químicas inéditas ( (Ownley, Gwinn, & Vega, 2010); (Yang, Zhang, & Luo, 2012)).

Stierle e co-autores (1993) descreveram pela primeira vez a possibilidade da biossíntese de compostos de origem endófito após a descoberta do fungo endófito *Taxomyces andreanae* que produz o composto anticancerígeno Taxol<sup>TM</sup> (nome genérico paclitaxel). Este fungo foi isolado a partir de um Teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*, e após esta descoberta inúmeros esforços têm sido feitos para identificar endofíticos como fonte de produtos naturais associados a plantas. Actualmente, alguns produtos de grande interesse terapêutico e comercial têm sido isolados de fungos endofíticos, nomeadamente o antineoplásico camptotecina (CPT) e os seus análogos estruturais, pró-drogas anticancerígenas podofilotoxina e deoxipodofilotoxina, os antidepressivos hipericina e emodina e os insecticidas naturais azadiractina A e B e é crescente o esforço e interesse pela descoberta e caracterização de novos endofíticos (Kusari & Spiteller, 2012).

Contudo, não se tem conseguido, como seria desejável, que estas descobertas sejam traduzidas num aumento de bioprocessos industriais que utilizam fungos endófitos, que permitam a produção e posterior comercialização de compostos biofarmacêuticos. Vários estudos têm evidenciado que a planta hospedeira e consequentemente o seu metabolismo, influencia a capacidade de biossíntese dos endofíticos, o que poderá ser uma das razões para explicar a dificuldade na utilização destes microrganismos na produção comercial de compostos bioactivos. De facto, a produção de metabolitos secundários biologicamente úteis por endofíticos, incluindo a produção de compostos miméticos aos metabolitos das plantas a eles associadas é importante quer numa perspectiva académica quer industrial, no entanto, a sua produção comercial é ainda incipiente (Kusari, Singh & Jayabaskaran., 2014).

Quase todas as técnicas de fermentação têm falhado, não permitindo a expressão constante dos genes biossintéticos necessária para sustentar a produção dos metabolitos de interesse. Tem-se observado que, em sucessivas culturas em condições de assépsia e utilizando uma cultura pura do fungo endofítico, se verifica uma redução substancial de metabolitos secundários produzidos. Isso pode ser explicado pelo facto destas condições de cultura *in vitro* não permitirem a indução da expressão de todos os genes biossintéticos dos fungos endofíticos, levando à produção de uma menor diversidade de metabolitos secundários do que a real capacidade

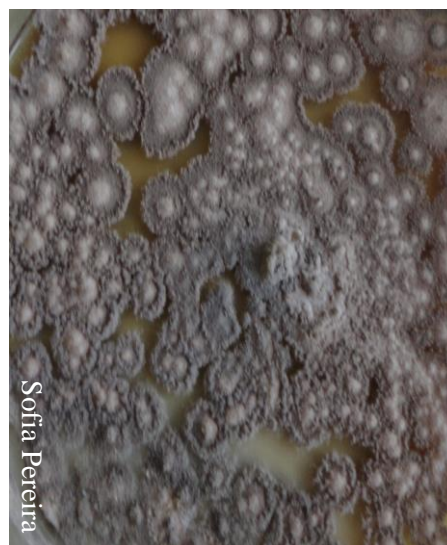


Figura 2: Fungos endófitos em meio PDA.

associada ao metaboloma do fungo (Figura 2). Isto tem ocultado o verdadeiro potencial dos fungos endofíticos como fábricas microbianas para a produção de metabolitos bioactivos de grande interesse ((Kusari & Spiteller, 2012); (Kusari, Verma, Lamshoft, & Spiteller, 2012); (Kusari, Singh & Jayabaskaran., 2014; (Alvin, Miller, & Neilan, 2014)).

Assim, é fundamental que se criem estratégias e condições simples, mas eficazes, que possibilitem o cultivo destes fungos e consequentemente a produção de compostos biologicamente activos. É importante a par de estratégias de isolamento e caracterização de novas espécies de microrganismos endofíticos sejam também optimizadas condições de crescimento e produção dos seus metabolitos secundários e posteriormente a sua purificação e caracterização. Para que seja possível entender e conseguir que a biossíntese de produtos por fungos endofíticos seja reprodutível em quantidade e diversidade começa-se por adoptar uma abordagem “ómica” acoplada a técnicas de Biologia de Sistemas (evolutivas, genómica, proteómica, metabolómica, transcriptómica, bioinformática, etc.) que começam a fornecer, com alta resolução, diferentes percepções sobre as interacções dos endófitos.

A bioprospecção de compostos bioativos naturais produzidos por fungos endofíticos tem sido feita tendo por base a selecção da espécie de planta hospedeira uma vez que, como já referido, esta pode influenciar a capacidade de biossíntese dos endofíticos e também porque se acredita que algumas propriedades terapêuticas atribuídas às plantas também possam estar relacionadas com a produção de metabolitos secundários pelos fungos endofíticos colonizadores dos tecidos vegetais. Assim, muitas plantas medicinais originárias de todo o mundo têm sido utilizadas como fontes destes microrganismos.

A oliveira, desde sempre, tem estado associada a usos medicinais e gastronómicos. No que respeita à sua importância medicinal, destacam-se as propriedades farmacológicas das folhas, descritas como anti-arrítmicas, espasmolíticas, imuno-estimulantes, cardioprotector, hipotensor, antihiperglicémico, antimicrobiano e anti-inflamatório (Mahjoub et al., 2011). Desta forma e como referido, as suas propriedades terapêuticas podem estar associadas à produção de metabolitos secundários pelos fungos endofíticos das suas folhas. Assim, a par do isolamento e caracterização de fungos endofíticos presentes na oliveira, é importante não só a purificação e caracterização de novos metabolitos com interesse biotecnológico/farmacêutico, mas também a optimização das condições de crescimento e produção desses microrganismos.

## 1.2. Objectivos e metodologias

Com o presente trabalho pretendeu-se:

- Optimizar as condições de crescimento e produção de compostos bioactivos de fungos endófitos da oliveira, nomeadamente, a concentração da glucose, pH, temperatura e agitação;

- ✚ Verificar o poder antimicrobiano dos compostos produzidos em bactérias gram positivas e negativas;
- ✚ Caracterizar os compostos bioactivos produzidos.

Para atingir os objectivos deste trabalho, foi utilizada a metodologia de planeamento factorial, sendo a análise dos dados experimentais efectuada com o auxílio de um programa estatístico (Design Expert, Versão 5.0), de um programa em linguagem R (versão 3.0.2), software para computação estatística. Outros resultados obtidos por computador nomeadamente a determinação de curvas de calibração e a maior parte dos gráficos apresentados nesta tese foram gerados em Microsoft® Office Excel® 2010 (Microsoft Corporation, EUA).

### **1.3. Organização da tese**

Tendo em conta os objectivos estabelecidos, o presente trabalho foi dividido em 5 capítulos.

No primeiro capítulo fez-se um breve enquadramento do tema, evidenciando-se ainda a necessidade da presente investigação, definiu-se os principais objectivos e metodologias utilizadas na realização do trabalho.

No segundo capítulo apresenta-se a revisão bibliográfica que incide sobre os principais temas relacionados com o objecto de estudo, os fungos endofíticos, e com o seu uso na produção de compostos bioactivos. O terceiro capítulo diz respeito ao material e métodos utilizados, sendo estes explicados pormenorizadamente. Os resultados experimentais obtidos durante o decorrer do desenvolvimento do trabalho, e a discussão dos mesmos são apresentados no quarto capítulo.

Por fim, a síntese do trabalho e conclusões gerais, bem como sugestões para trabalhos futuros dentro do mesmo campo de estudo são apresentadas no capítulo cinco.

## Capítulo 2

### Potencial biotecnológico dos fungos endófitos







## 2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS ENDÓFITOS

### 2.1. Fungos Endofíticos: produtores de metabolitos bioactivos

Os endofíticos são um grupo abundante e diversificado de microrganismos ubiquitários que crescem no interior de plantas, durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem lhes causarem sintomas aparentes de doença. Vários estudos têm evidenciado que estes microrganismos e, de modo particular, os fungos endofíticos são capazes de colonizar os tecidos de todas as plantas, independentemente da sua taxonomia e localização ambiental (Chithra et al. 2014; Huang et al., 2014; Kusari et al., 2012; Kusari et al., 2014).

Os endófitos dividem-se em dois grupos, os clavicipitáceos e os não-clavicipitáceos (Rodriguez et al., 2009). Os fungos pertencentes ao primeiro grupo têm como principal característica serem benéficos para a planta hospedeira, levando ao seu crescimento e a uma maior tolerância a ataques externos, através da produção de compostos bioactivos (Torres et al., 2012). No caso dos não-clavicipitáceos os efeitos no seu hospedeiro poderão ser nocivos ou benéficos, sendo os benéficos similares aos observados nos clavicipitáceos (Waqas et al., 2012). Têm também um elevado valor farmacológico e biotecnológico, devido à produção de vários compostos bioactivos, sendo no entanto o grupo menos estudado.

A estrutura e composição em fungos são influenciadas por vários factores, nomeadamente, geográficos, climáticos, sazonais, da identidade da planta hospedeira, da estrutura e diversidade da vegetação circundante, assim como, da especificidade do tecido vegetal colonizado. Consequentemente, existem vários tipos de fungos endofíticos, sendo estes específicos para cada condição ambiental e tipo de tecido colonizado, como resultado da sua adaptação a essas diferentes condições. Estes fungos têm um enorme impacto sobre a planta hospedeira especialmente ao nível do seu estado físico, da sua resistência e susceptibilidade a doenças e ao modo como se decompõe, tendo também efeitos diferentes dependendo do seu local de crescimento. Por exemplo, caso se desenvolvam nas raízes, têm um papel preponderante na fixação de azoto, no caso de se encontrarem nas folhas potenciam a produção de compostos secundários. Sendo assim, apesar da grande maioria dos fungos endofíticos e do seu significado ecológico ainda não estar devida e totalmente caracterizados, pressupõe-se que variem de acordo com a planta hospedeira e o meio ambiente (Huang et al., 2014).

A bioprospecção, isolamento e caracterização de fungos endofíticos têm sido realizadas tendo em conta a sua capacidade para produzir metabolitos secundários biologicamente activos com uso potencial na medicina, agricultura entre outras áreas. Tem sido proposto, que estes fungos adquirem uma capacidade biossintética diversificada, através da co-evolução e recombinação genética com a sua planta hospedeira. Para além disso, a sua relação simbiótica com a planta obriga-os a lidar com diversos compostos tóxicos produzidos pelo seu hospedeiro como defesa contra outros organismos. Assim, pensa-se que a existência de processos de biodegradação e biotransformação das substâncias tóxicas, pela ajuda de

certas enzimas específicas, permitem a sobrevivência dos fungos endofíticos. Esta é de facto, uma nova área de interesse na pesquisa de fungos endofíticos, pois estes são reconhecidos como uma fonte de biodiversidade catalítica, ainda pouco explorada, podendo ser uma fonte potencial de novos biocatalisadores para a transformação química de produtos naturais e drogas (Huang et al., 2014; Xie e Dai, 2015).

De facto, os fungos endofíticos possuem uma grande biodiversidade e um potencial de biosíntese de metabolitos biactivos pouco explorado. O perfil de metabolitos destes fungos é muito influenciado pelo ambiente químico da planta hospedeira, tendo sido reportado que alguns desses endofíticos possuem um metabolismo capaz de sintetizar compostos específicos da planta o que parece ser uma forte indicação da interacção entre o endofítico e a planta hospedeira (Chithra et al. 2014).

### **2.1.1. Relação entre o fungo endofítico e a planta hospedeira**

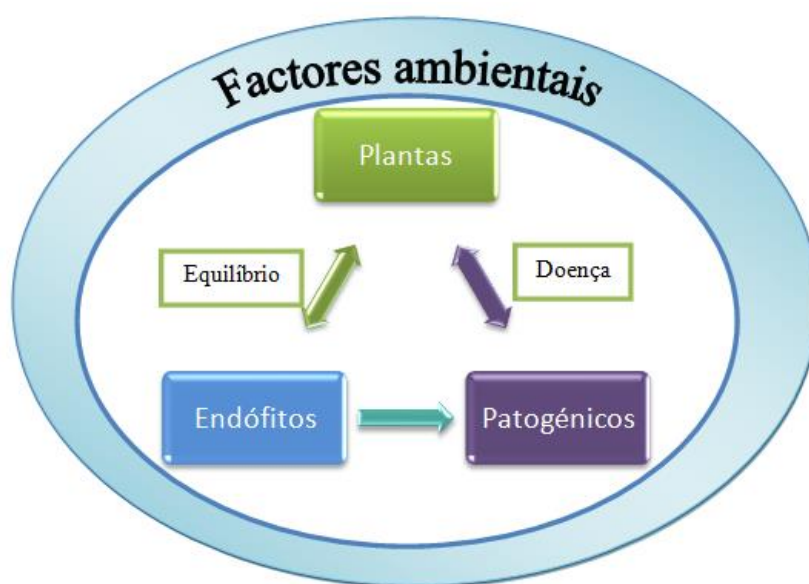
Muitos estudos têm-se focado na forma como é feita a inserção dos fungos endófitos no interior do seu hospedeiro, constatando-se que esta depende fundamentalmente das condições da planta, ou seja, podem ser transmitidos via semente ou após a germinação (Petrini, 1996) e posteriormente desenvolvem-se a par com a planta, podendo dar-se também o caso das plantas não oferecerem condições para que este processo ocorra. Nesta situação, a inserção dos fungos é feita a partir de aberturas naturais (estômatos, raízes secundárias) ou artificiais (cortes devido a contacto com instrumentos agrícolas, atrito das raízes com o solo), após a qual os fungos se desenvolvem, tal como no caso anterior, no interior das plantas não formando estruturas externas visíveis (Caruso et al., 2000).

Apesar de ainda não se ter um vasto conhecimento relativamente à relação entre hospedeiro e endófito, esta pode ser compreendida entre um dos três grupos seguintes: neutra, simbiótica ou antagonica. A relação com mais interesse académico e comercial é aquela em que existe simbiose, logo onde existe produção de metabolitos secundários por parte dos fungos, podendo levar a efeitos benéficos na planta, tais como defesas contra ataques externos de outros organismos (Clay, 1988; D'Mello e Macdonald, 1997). Contudo, a relação simbiótica existente entre o fungo e o seu hospedeiro vai muito além da defesa de agentes externos. Nessa interacção, o fungo endófito aumenta o crescimento, reprodução e resistência/tolerância a stresses bióticos (insectos, herbívoros, fitopatogénicos) e abióticos (stresse hídrico, salinidade, metais pesados, entre outros) da planta hospedeira (Saikkonen et al., 2004; Jalgaonwala et al., 2011).

Por sua vez, a planta hospedeira serve de refúgio ao endófito protegendo-o e fornece-lhe os nutrientes necessários para o seu crescimento (Saikkonen et al., 2004). Existe uma relação profunda e complexa entre estes dois elementos, ocorrendo trocas entre o fungo e a planta, ou seja, os produtos naturais formados por cada um dos elementos no processo pode servir para fornecer metabolitos secundários ao outro. Coloca-se também a hipótese de

determinados compostos produzidos pelo fungo, nos quais predominam características de origem vegetal, terem sido na realidade produtos formado pelo hospedeiro, tendo o fungo posteriormente reagido de forma a produzir os seus metabolitos secundários, ocorrendo deste modo uma relação que permite uma recombinação genética com características de ambos os organismos (Stierle et al., 1993).

Como referido, a interacção com mais interesse e que normalmente acontece entre fungo endófito-planta hospedeira é de simbiose, no entanto pode também tornar-se parasita originando doença na planta hospedeira (Schulz e Boyle, 2005). Na Figura 3 está esquematizada a possível interacção entre fungo e planta hospedeira.



**Figura 3:** Esquema do estabelecimento de relações de simbiose ou parasitas entre fungo endófito - planta hospedeira (adaptado de Schulz e Boyle, 2005). A ocorrência de equilíbrio entre a resposta de defesa da planta e a virulência do fungo resulta numa interacção de simbiose. Na ausência de equilíbrio a interacção é parasita ocorrendo doença.

Pensa-se que a interacção de simbiose é o resultado de um equilíbrio estabelecido entre a resposta de defesa da planta à invasão fúngica e a virulência (Schulz e Boyle, 2005) ou as necessidades nutricionais do endófito, bem como das condições ambientais onde decorre a interacção (Kogel, 2006). Se por qualquer motivo este equilíbrio for perturbado, surgem sintomas de doença na planta ou alternativamente o fungo é excluído devido a reacções de defesa da planta (Kogel, 2006).

### **2.1.2. Isolamento e identificação de fungos endofíticos**

O isolamento de fungos endofíticos é efectuado normalmente através de pequenos fragmentos de plantas (folha, caule, raiz, entre outros) previamente esterilizados (Hallmann et al. 2006). Os agentes de esterilização são normalmente o etanol a 70%, o hipoclorito de sódio (1 a 3% de cloro activo) (Qadri et al., 2013) ou cloreto de mercúrio (0,1%) (Ding et al., 2013), sendo o tempo de exposição variável de acordo com o material vegetal. Após lavagem com

água destilada estéril, consegue-se que os fragmentos das plantas estejam superficialmente esterilizados, sendo colocados de seguida e em condições de assepsia em placas de *Petri* contendo meio selectivo para fungos suplementado com antibiótico, para evitar o crescimento de possíveis bactérias endofíticas (Hallmann et al., 2006). O meio habitualmente utilizado é o Batata Dextrose Agar (PDA) e por vezes são também adicionados tecidos ou extractos vegetais da planta hospedeira de forma a promover o crescimento de fungos específicos dessa planta (Arnold et al., 2003). Na Figura 4 pode-se observar um fungo *Penicillium commune* isolado da oliveira em meio PDA.



Figura 4: *Penicillium commune* de planta de oliveira em meio PDA.

A eficácia da esterilização do material vegetal utilizado no isolamento dos fungos deverá sempre ser confirmada, o que é feito, normalmente, pela análise microbiológica da água destilada utilizada na última lavagem.

Após o processo de esterilização e inoculação em placas de *Petri* com meio selectivo de isolamento para fungos, estas são incubadas no escuro a 25 °C. Diariamente o crescimento fúngico é avaliado e após o desenvolvimento de colónias, estas são repicadas para novas placas de *Petri* com o mesmo meio, até a obtenção de culturas puras (Hallmann et al., 2006).

A identificação dos fungos endofíticos é conseguida através da análise das características morfológicas das colónias fúngicas formadas, do seu micélio e das estruturas reprodutivas (Agusta, Wulansar, Praptiwi, Nurkanto, & Fathoni, 2014), sendo ainda normalmente efectuada uma identificação molecular (Huang, An, Song, Mao, Shen, & Dong, 2014).

Essa identificação molecular baseia-se na análise da região ITS (*Internal transcribed spacer*) do ADN que contém o conjunto de genes que codificam o ARN ribossómico (rARN), considerada como a região “*barcoding*” (código de barras do ADN) de fungos, por permitir uma maior variabilidade entre espécies (Chithra, Jasim, Sachidanandan, Jyothis, & Radhakrishnan, 2014).

## **2.2. Bioprospecção de metabolitos bioactivos em fungos endofíticos**

Um grande número de compostos naturais foi já isolado a partir de fungos endofíticos, demonstrando possuir uma ampla gama de actividade biológica, nomeadamente antioxidante, antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, insecticida, neuroprotectiva, antidiabética, propriedades imunossupressoras, anticolinesterásica, antineoplásicos e citotóxica (Ownley, Gwinn, & Vega, 2010); (Yu, et al., 2010); (Zhang, et al., 2009); (Shweta, et al., 2012);

(Wang, 2012)). Para além disso, poderão ainda ser utilizados como materiais de partida para a produção de compostos farmacêuticos ou agroquímicos. Estes metabolitos bioactivos naturais isolados de fungos endófitos provêm de diferentes vias metabólicas e pertencem a diversos grupos estruturais tais como isocumarinas, fenóis, esteróides, terpenos, xantonas, quinonas, benzopirenos, tetralonas, citocalasinas e eniatinas ((Yu, et al., 2010); (Kaul, Gupta, Ahmed, & Dhar, 2012); (Radić & Štrukelj, 2012); (Alvin, et al., 2014)).

Actualmente, alguns produtos de grande interesse terapêutico e comercial têm sido isolados de fungos endófitos, nomeadamente o anticancerígeno paclitaxel, também conhecido como Taxol<sup>TM</sup> (Stierle et al., 1993), o antineoplásico camptotecina (CPT) e os seus análogos estruturais (Puri et al, 2005; Kusari et al., 2009a, 2011a; Shweta et al., 2010), pró-drogas anticancerígenas podofilotoxina (Eyberger et al, 2006; Puri et al, 2006) e deoxipodofilotoxina (Kusari, et al., 2009), os antidepressivos hipericina e emodina (Kusari et al., 2008, 2009c) e os insecticidas naturais azadiractina A e B (Kusari, et al., 2012) e é crescente o esforço e interesse pela descoberta e caracterização de novos endófitos (Kusari S. e., 2012).

Mahapatra e Banerjee (2013) descrevem a optimização da produção de um exopolissacárido bioactivo pelo fungo endófito *Fusarium solani* SD5 enquanto que, Agusta et al. (2014) descrevem a utilização do fungo *Coelomycetes* AFKR-3 isolado da planta *Yellow Moonshed* (*Archangelisia flava* (L.) Merr.) para a biotransformação da berbarina no seu derivado óxido-7-*N* de berbarina. Este composto apresenta a mesma actividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogénicos, mas com menor toxicidade. De facto, têm sido cada vez maiores os esforços conduzidos para a pesquisa de compostos que apresentam actividade antimicrobiana, como patente na Tabela 1.

**Tabela 1: Fungos endófitos e seus metabolitos com atividade antimicrobiana (adaptado de Yu et al., 2010; Radic e Strukelj, 2012).**

Fungo endófito	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	<i>Zygophyllum fontanesii</i>	Fusidienol A 8-Hydrox-6-metil-9-oxo- 9H-xanthene-1-acido carboxílico Ester metílico	<i>Escherichia coli</i>	Krohn et al. 2009
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Sonneratia alba</i>	Desconhecido	<i>Enterococcus cloacae</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kjer et al. 2009
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Garcinia scorteichinii</i>	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Ramasamy et al. 2010
<i>Acremonium zeae</i>	Milho	Alcalóides	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Candida albicans</i>	Wicklow et al., 2005

**Tabela 1 (continuação): Fungos endofíticos e seus metabolitos com atividade antimicrobiana (adaptado de Yu et al., 2010; Radic e Strukelj, 2012).**

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Ampelomyces sp.</i>	<i>Urospermum picroides</i>	Quinonas	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aly et al. 2008
<i>Cladosporium sp</i>	<i>Quercus variabilis</i>	Compostos alifáticos	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>	Wang et al. 2000
<i>Periconia sp.</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	Periconicin A Periconicin B	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kim et al. 2004
<i>Muscodora albus</i>	Árvores tropicais	Péptidos	<i>Candida albicans</i>	Strobel et al. 1999
<i>Phoma sp.</i>	<i>Saurauia scaberrinae</i>	Fenóis	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Hoffman et al. 2008
<i>Phomopsis sp.</i>	<i>Aspidosperma tomentosum</i>	Desconhecido	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Corrado e Rodrigues 2004
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	<i>Lycium intricatum</i>	Microsphaeropsone A Microsphaeropsone C Citreoosin Enone	<i>Escherichia coli</i>	Krohn et al. 2009
<i>Chloridium sp.</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Javanicin	<i>Bacillus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kharwar et al. 2009
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	Ergosterol Ácido helvólico Monomethylsulochrin 3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy-ergosta-6,22-diene	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Sarcina lutea</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Li et al. 2005
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Compostos alifáticos Alcalóides	<i>Mucor miehei</i>	Qin et al. 2009

A bioprospecção de metabolitos de fungos endofíticos poderá igualmente contribuir para o aparecimento de novas alternativas para os antibióticos e antifúngicos de amplo espectro. Com efeito, a segunda causa de morte a nível mundial são as doenças infecciosas e parasitárias, constituindo o aumento da sua incidência, uma crescente preocupação, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014). Esta Organização, assim como, o Centro Europeu para a Prevenção e Controlo de Doenças, têm alertado para a necessidade e urgência em encontrar alternativas para os antibióticos e antifúngicos de amplo espectro actualmente disponíveis, contra as bactérias e fungos patogénicos para os humanos, que se têm mostrado cada vez mais multiresistentes.

O grupo de bactérias patogénicas recentemente denominado como “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

*baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter species*) são a causa da maior parte das infecções hospitalares e efectivamente têm demonstrado uma capacidade para “escapar” à acção dos antibióticos. Têm-se observado um aumento da resistência de bactérias patogénicas, quer de *Gram* positivas quer *Gram* negativas, o que tem dificultado o sucesso do tratamento das doenças infecciosas. Por outro lado, relativamente aos antifúngicos, a sua maior limitação prende-se com a sua baixa selectividade e elevada toxicidade, uma vez que as células fúngicas e as humanas apresentam-se semelhantes (Gupte, Kulkarni, & Ganguli, 2002). Os fungos que têm provocado maior preocupação a nível Europeu são o *Aspergillus fumigatus* responsável pela maior parte das aspergiloses, a *Candida albicans* (ou outras espécies de *Candida spp.*, como sejam *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) são responsável pelas candidíases sistémicas e o *Cryptococcus neoformans* que provoca a criptococose (Lass-Flörl, 2009).

A bioprospecção de metabolitos fúngicos envolve, geralmente, quatro etapas: isolamento e identificação do fungo endofítico, cultura do fungo e optimização da produção de metabolitos, caracterização da natureza química do metabolito e avaliação das suas propriedades biológicas. Uma das etapas que tem actualmente aumentado o interesse da comunidade académica é a etapa do crescimento dos fungos e optimização da produção dos metabolitos com valor comercial.

Essa etapa tem como maior desafio conseguir reproduzir e optimizar a produção dos compostos que é observável no ecossistema e quando há a interacção entre o fungo e a planta hospedeira.

### 2.3. Condições de Crescimento de fungos e optimização da produção de metabolitos

De modo a utilizar comercialmente os fungos endofíticos na produção sustentável de produtos com propriedades bioactivas, é necessário desenvolver um bioprocesso adequado que optimize as condições de produção, de modo a tornar o processo economicamente viável. O estabelecimento das condições mais adequadas do bioprocesso é, normalmente, realizado caso a caso.

O crescimento de fungos endofíticos *in vitro* tem como principal objectivo aumentar a sua capacidade de produção. Normalmente, a cultura é feita em meio líquido e são efectuadas alterações quer em termos da composição química do meio de cultura, quer no valor de pH, temperatura e agitação. Um exemplo deste tipo de cultura encontra-se na Figura 5.



Figura 5: Crescimento de fungos endófitos por fermentação submersa.

Como o objectivo é otimizar o processo fermentativo com vista ao aumento da produção, por vezes é ainda acrescentado ao meio de cultura extractos da planta hospedeira (Yu, et al., 2010). Na Tabela 2 é feito um resumo de várias condições de cultura de fungos endofíticos que são descritas na literatura.

Tabela 2: Condições de fermentação de fungos endofíticos e metabolitos formados.

Fungo	Condições de fermentação	Compostos formados	Referência
<i>Chaetomium</i> ( <i>C.</i> ) <i>globosum</i> L18	Meio de cultura: 300mL de PDB Condições de fermentação: 150 rpm, 28°C Duração: 8 dias	<i>Chaetoblobosin L</i> <i>Ergosterol</i> <i>Ergosterol 5<math>\alpha</math>,8<math>\alpha</math>-peroside</i>	(Wang, 2012)
<i>Berkleasmium</i> <i>sp. Dzfl2</i>	Meio de cultura: 100mL de PDB Condições de fermentação: 150 rpm, aerobiose a 25°C Duração: 4 dias	<i>Palmarumycin C<sub>12</sub></i> <i>Palmarumycin C<sub>13</sub></i>	(Li, et al., 2012)
<i>Massrison sp.</i>	Meio de cultura: 100 mL de PDB (0,4g de extrato de batata; 2g de dextrose; 100mL de água destilada) Condições de fermentação: 180 rpm, aerobiose, 28 °C, pH de 7 Duração: 6 dias	<i>Massarigenin D</i> <i>Spiromassaritone</i> <i>Paecilospirone</i>	(Sun, 2011)



Tabela 2 (continuação): Condições de fermentação de fungos endofíticos e metabolitos formados.

Fungo	Condições de fermentação	Compostos formados	Referência
<i>Phoma sp.</i>	Meio de cultura: 50mL de PDB Condições de fermentação: 180 rpm, 28°C Duração: 7 dias	<i>2-Hydroxy-6-Methylbenzoic acid</i>	(Zhang H. X., 2012)
<i>Taxus baccata</i>	Meio de cultura: 30mL de PDB Condições de fermentação: 160 rpm, 20°C Duração: 21 dias	<i>Aureobasidium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Humicola</i> <i>Phoma</i>	(Caruso, et al., 2000)

## 2.4. Problemas e desafios na utilização industrial de fungos endofíticos

As plantas continuam a ser dos bens públicos mais preciosos da Humanidade com uma enorme bio e quimiodiversidade. Assim, é praticamente infinita a diversidade da comunidade de microrganismos endofíticos competentes que podem ser isolados de plantas de todos os nichos ecológicos e agrícolas, isto é, microrganismos capazes de produzir determinados metabolitos secundários bioactivos em fermentações *in vitro*, com interesse farmacêutico. De facto, é crescente o interesse na pesquisa de novos fungos endofíticos e consequentemente nos seus metabolitos, patente no aumento dos números de referências bibliográficas sobre o assunto. No entanto, o aumento do isolamento de novas espécies endofíticas e caracterização química de novos tipos de compostos com propriedades biológicas não se tem traduzido num aumento de bioprocessos a nível industrial (Kusari e tal., 2014).

Se por um lado, a interacção entre o fungo e a sua planta hospedeira começa a ser mais compreendida, por outro, a nível laboratorial é difícil reproduzir a produção dos metabolitos formados resultantes dessa interacção. De facto, a capacidade de produção dos fungos endofíticos isolados em laboratório poderá não ser 100% semelhante ao que acontece no ecossistema fungo-planta hospedeira. Por outro lado, a maioria dos fungos endofíticos descobertos são fungos Ascomycota filamentosos (Kusari e tal., 2014), os quais têm sido utilizados com algum sucesso na biotecnologia branca. No entanto, a sua utilização na chamada biotecnologia vermelha, onde se pretende alcançar elevadas produtividades dos metabolitos de interesse, tem-se mostrado mais difícil requerendo uma maior caracterização dos referidos fungos, nomeadamente da sua morfologia, que permita um eficaz aumento de escala e sucesso na transposição das fermentações à escala laboratorial para a escala industrial.

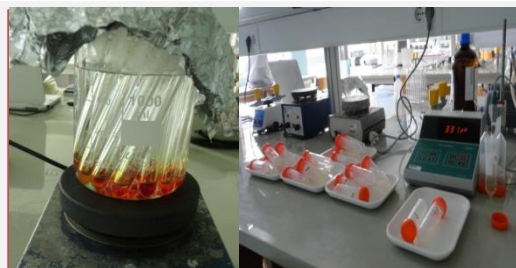
Por outro lado, a correcta identificação dos fungos endofíticos é uma tarefa complicada devido à grande maioria exibir diferentes polimorfismos nas plantas e em culturas *in vitro*. Mais ainda, diferentes fungos endofíticos apresentam diversas características

morfológicas em fermentações realizadas à escala laboratorial, que se alteram de fermentação para fermentação, limitando a capacidade de previsão das suas propriedades reológicas, a análise do rendimento na produção de metabolitos de interesse e a monitorização em linha à escala piloto ou industrial (Posh et al., 2013). É ainda de referir que a maioria dos estudos realizados referem-se a fermentações descontínuas, pese embora as vantagens conhecidas das fermentações em contínuo. Contudo, a produção controlada e sustentável de metabolitos e de um modo reprodutível é difícil (Posh et al., 2013).

Assim, um dos principais desafios nesta área, a par da identificação de novos microrganismos, é conseguir a implementação de bioprocessos a nível laboratorial e industrial. Para alcançar esses objectivos é fundamental a aplicação de novas ferramentas da Biologia de Sistemas, assim como, ferramentas estatísticas baseadas em desenho óptimo de experiências e controlo de processos. É fundamental que se criem estratégias e condições simples mas eficazes que possibilitem o cultivo destes fungos e consequentemente a produção de compostos biologicamente activos.

## Capítulo 3

### Material e métodos





### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo é feita a referência dos materiais e métodos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Microrganismos e Reagentes

Neste trabalho experimental foram utilizados os fungos endófitos isolados de oliveira, gentilmente cedidos pela Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Os fungos utilizados foram o *Fusarium oxysporum* (PAI21.RZ) e o *Penicillium commune* (PAL321.FAI) (Figura 6)

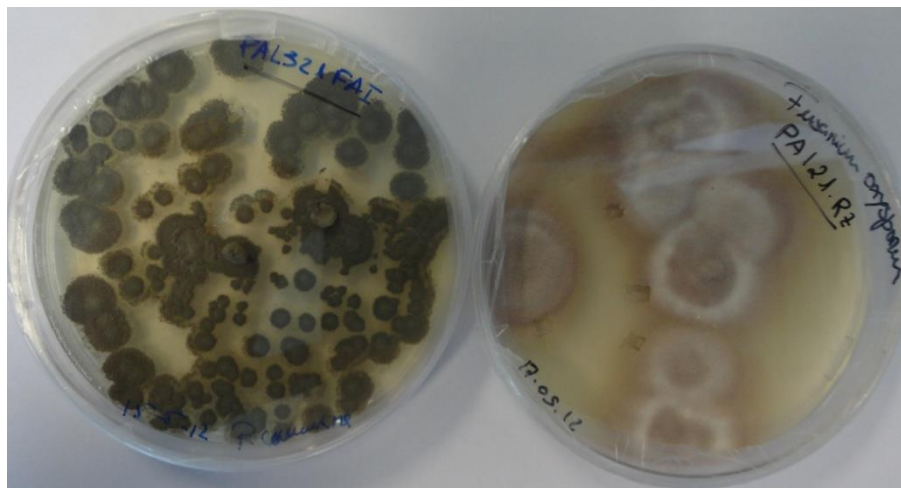


Figura 6: Fungos endófitos PAL321.FAI e PAI21.RZ isolados da oliveira, na Escola Superior Agrária de Bragança

Como microrganismos teste, nos ensaios de avaliação da capacidade antimicrobiana dos extractos fúngicos, foi utilizada a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* (ATCC 10536) e a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Na preparação do inóculo para as várias fermentações realizadas foi utilizado o *Tween 80* da *Sigma-Aldrich*, de modo a facilitar a remoção dos esporos do fungo do *slant*. Para a formulação de meios de cultura para crescimento dos fungos foi utilizado extracto de levedura da *Fisher BioReagents*, peptona da *Himedia* e glucose *Fisher Chemical*. Foi ainda utilizado o meio de cultura PDA. Na determinação da actividade antibacteriana foi utilizado o meio Agar de *Mueller-Hinton* da *Merck*.

O meio de cultura utilizado nas fermentações para a optimização das condições de crescimento e produção de metabolitos foi o meio modificado MMN (*modified Melin-Norkrans*) cuja composição está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Composição do meio de cultura MMN.

Reagente	Pureza(%)	Marca	g/L
NaCl	99,0	<i>Rectapur®</i>	0,025
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	99,0	<i>Merck</i>	0,250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	99,5	<i>Merck</i>	0,500
FeCl <sub>3</sub>	99,0	<i>Merck</i>	0,050
CaCl <sub>2</sub>	99,0	<i>Riedel-de Haën</i>	0,500
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	99,0	<i>Applichem</i>	0,150
Tiamina	99,0	<i>Fisher BioReagents</i>	0,100
Casaminoácidos	99,0	<i>Difco Bacto</i>	1,000
Extrato de malte	99,0	<i>Himedia</i>	1,000
D-Glucose	99,0	<i>Fisher Chemical</i>	10,000

Na determinação do peso seco, foram usados os filtros da marca *Whatman* com diâmetro 47 µm e porosidade 0,54 mm. Foram ainda usados discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm também da marca *Whatman*, nos ensaios de avaliação da actividade antimicrobiana. Nestes ensaios foi utilizado como controlo positivo o antibiótico Tetraciclina, adquirido da Sigma.

Foi ainda utilizada água destilada na preparação dos meios e soluções, obtida através do destilador *Distinction*.

### 3.1.2. Equipamento

Para a preparação dos meios de cultura foi utilizada uma balança analítica *Mettler Toledo* modelo AB204. O pH foi medido num medidor de pH *Metrohm/Brinkmann*, modelo 691 pH Meter. Foi utilizada uma autoclave Trade Raypa AV-100, uma câmara de fluxo laminar Telstar e uma incubadora *P-selecta*. A agitação foi conseguida usando um agitador orbital *IKA®*, modelo *KS 130 basic*.

Na determinação do peso seco foi utilizada uma bomba de vácuo (*Vacuubrand*) a 80 mbar e uma estufa *Raypa®*.

Na contagem de esporos fúngicos foi utilizado o estereomicroscópio e o microscópio *Nikon Alaphot-2 YS2* com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Na concentração dos extractos fúngicos para os ensaios de avaliação das propriedades antimicrobianas foi utilizado um evaporador (*Buchi*) com rotação na posição 7 (R-210) com um banho de aquecimento (B-491) a 39°C. Foi também utilizado um espectrofotómetro marca *Mapada* modelo UV-1800 na quantificação da glucose consumida.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparação do inóculo

Foram preparados tubos de ensaio com meio PDA inclinado (*slant*) e inoculados com os fungos endofíticos estudados. Foram sendo feitas sucessivas repicagens de modo a ter sempre uma cultura fresca de microrganismo. Após a inoculação, procedeu-se à incubação dos fungos a 25 °C, durante 5 dias.

Verificou-se que o fungo *Fusarium oxysporum* (PAI21.RZ) apresentava um crescimento mais rápido que o *Penicillium commune* (PAL321.FAI), pelo que foi o utilizado no restante trabalho desenvolvido.

Após se verificar o crescimento do fungo e formação de esporos, foi adicionado aos tubos de ensaio uma solução aquosa de *Tween 80* (0,02%). Esta solução facilita a remoção dos esporos do meio de cultura. Posteriormente, foram agitados os tubos de ensaio de modo a homogeneizar a suspensão e a facilitar a libertação dos esporos (Figura 7).



Figura 7: Remoção dos esporos com solução aquosa de Tween 80.

De seguida, foi retirada uma pequena quantidade desta suspensão de modo a realizar a contagem do número de esporos. Essa contagem foi feita ao microscópio com o auxílio de uma câmara de *Neubauer*. Sabendo-se que, na zona central da lâmina de vidro se encontra gravada uma grelha em cruz formando no centro um quadrado, o qual se subdivide em 400 quadrados com 1/400 mm<sup>2</sup> de área cada, agrupados em 25 quadrados maiores, selecionaram-se os quadrados central e angulares para a contagem dos esporos. No caso de existirem esporos nos limites, ou seja, que se apresentassem sobre a linha, apenas foram considerados os que se encontravam à direita e em baixo, os da esquerda e em cima foram considerados pertencentes às quadrículas vizinhas (Figura 8).

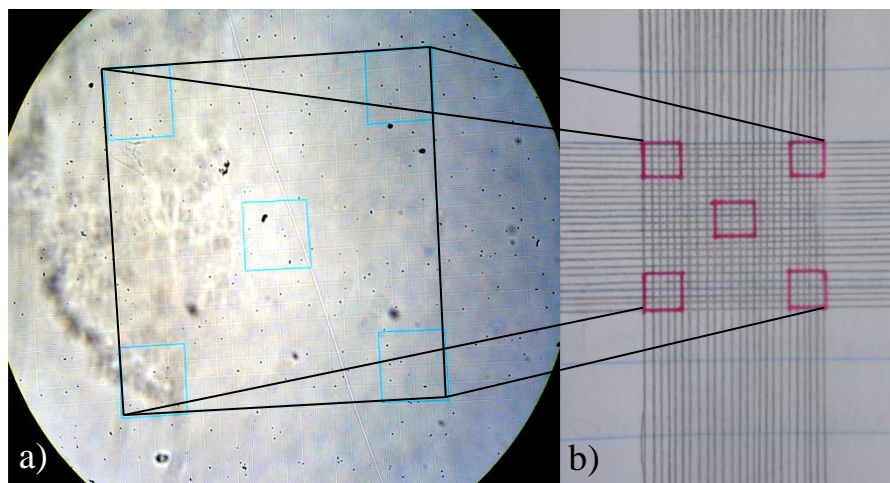


Figura 8: Contagem de esporos ao microscópio com câmara de *Neubauer* a) vista ao microscópio, 40x, b) desenho de câmara de *Neubauer*.

Para a determinação quantitativa dos esporos presente na amostra utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Número de esporos/mL} = \frac{\text{Número médio de esporos nos 5 quadrados} \times 25}{0,0001 \text{ mL}} \quad \text{Equação 1.}$$

Quando a suspensão apresentou uma concentração inferior a 10 milhões de esporos por mL procedeu-se à sua concentração por centrifugação. Pelo contrário, quando a concentração foi muito mais elevada tornava-se impossível fazer a contagem, necessitando-se desse modo de diluir a amostra em estudo.

### 3.2.2. Fermentação

O meio de cultura utilizado foi o meio MMN, como referido anteriormente. Foram realizados ensaios em matrizes de 100 mL contendo 20 mL de meio de cultura. Após a contagem do número de esporos e assegurando que a concentração de esporos inoculados era sempre aproximadamente igual, transferiu-se para cada matraz com meio de cultura estéril, 20 µL de suspensão. Nas primeiras experiências a incubação foi feita a 25 °C e 180 rpm, tendo-se realizado amostragens em dias específicos (Figura 9).



Figura 9: Aspecto de uma fermentação submersa do fungo *Fusarium oxysporum*, após 28 dias de crescimento.



Como se pretendia otimizar as condições de crescimento do fungo e de produção foram realizadas várias fermentações onde se alteraram as seguintes condições: Concentração de glucose (1, 2 e 3%), pH (5,5: 6,5 e 7,5), temperatura (20, 25 e 30 °C) e agitação (80, 160 e 240). Para facilitar este estudo foi elaborado um desenho experimental apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4: Condições ambientais variadas no desenho experimental.**

	Temperatura (°C)	Velocidade de agitação (rpm)	pH	[Glucose], %
Experiências em simultâneo	20	80	5,5	1
	20	80	5,5	3
	20	80	7,5	1
	20	80	7,5	3
	20	240	5,5	1
	20	240	5,5	3
	20	240	7,5	1
	20	240	7,5	3
	25	160	6,5	2
Experiências em simultâneo	30	80	5,5	1
	30	80	5,5	3
	30	80	7,5	1
	30	80	7,5	3
	30	240	5,5	1
	30	240	5,5	3
	30	240	7,5	1
	30	240	7,5	3

Em cada experiência foram retiradas amostras ao fim de 14, 24 e 28 dias. Tendo-se preparado 2 matrizes para cada amostra. Assim, para cada fermentação foram preparados 6 matrizes nas mesmas condições.

Após o tratamento das amostras obtidas do desenho experimental, observou-se que seria necessário para uma determinação mais precisa do ponto óptimo de crescimento efectuar mais experiências no ponto central, a 25°C. Desta forma, foram realizadas fermentações a 25°C e uma velocidade de agitação de 160 rpm, com variações de pH e concentração de glucose. As condições das fermentações à temperatura de 25°C encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Condições ambientais variadas no desenho experimental a 25°C.

	Temperatura (°C)	Velocidade de agitação (rpm)	pH	[Glucose], %
Experiências em simultâneo	25	160	5,5	1
	25	160	5,5	2
	25	160	5,5	3
	25	160	6,5	1
	25	160	6,5	2
	25	160	6,5	3
	25	160	7,5	1
	25	160	7,5	2
	25	160	7,5	3

Foram realizadas amostras ao fim de 7 e 14 dias. Para isso, para cada amostra foram preparados 2 matrizes. Assim, para cada fermentação foram preparados 4 matrizes nas mesmas condições (Figura 10).



Figura 10: Fermentação submersa de fungo endófito, *Fusarium oxysporum*.

Para cada amostra realizada foi quantificado o crescimento do fungo por avaliação do peso seco, o pH do extracto e a quantificação da glucose consumida pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico).

### 3.2.2.1. Determinação do peso seco

A quantificação do crescimento do fungo foi realizada através da determinação do peso seco.

Esta foi realizada por filtração por vácuo como apresentada na Figura 11.



Figura 11: Montagem de sistema de filtração a vácuo utilizada na quantificação da concentração de biomassa.

Neste processo foram utilizados filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  porosidade e 47 mm de diâmetro previamente desumidificados durante aproximadamente 16 horas a 105°C. Após a filtração de todo o meio de cultura, os extractos foram armazenados a -20 °C para análise posterior e os filtros colocados numa estufa a 105°C até peso constante (Figura 12).

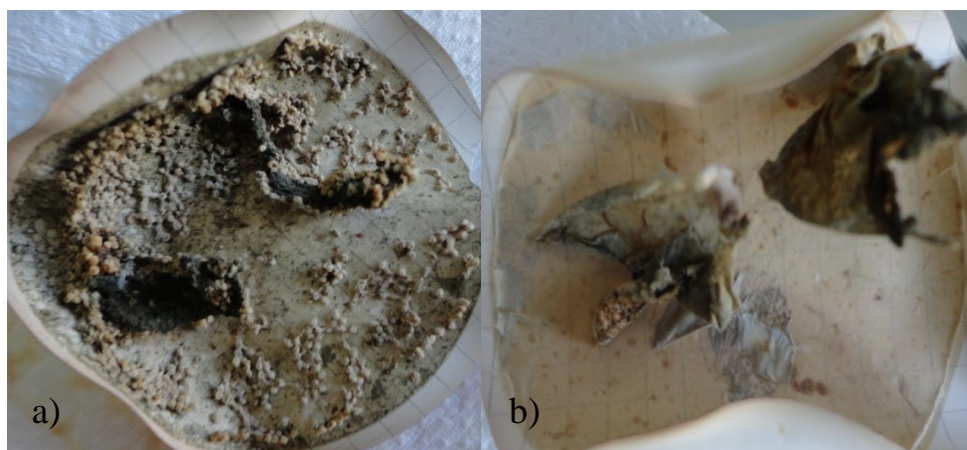


Figura 12: Biomassa a) antes e b) após secagem.

### 3.2.2.2. Determinação da glucose consumida

A concentração de glucose foi determinada pelo método de DNS, utilizado para quantificar açúcares redutores. Para isso, foram preparadas soluções padrão através da diluição de uma solução de glucose de concentração 10g/L. As soluções padrão foram preparadas seguindo o esquema da Figura 13. Estas soluções padrão foram utilizadas para determinar a curva de calibração.

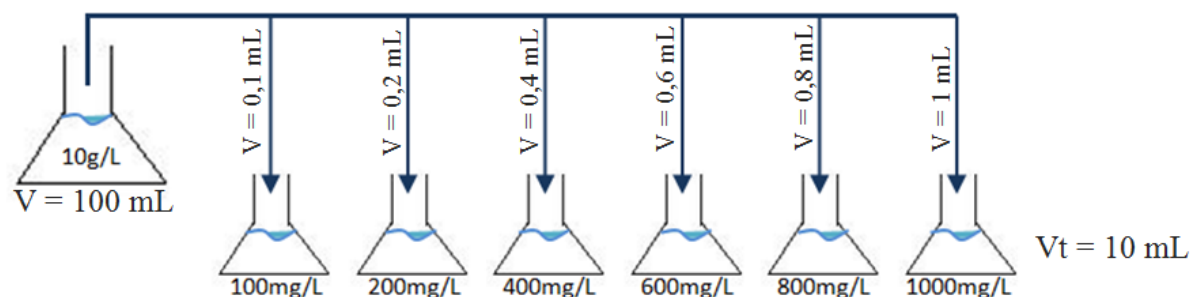


Figura 13: Esquema de preparação das soluções padrão utilizadas na determinação da recta de calibração.

Num tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL de solução padrão aos quais se adicionou 0,5 mL de DNS. Este procedimento foi efectuado para cada concentração das soluções padrão e em triplicado. Os vários tubos de ensaio foram colocados num banho a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. Após esse período retiraram-se os tubos do banho e deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente (Figura 14). De seguida, adicionou-se a cada tubo de ensaio 5 mL de água destilada. Como branco foi utilizada água destilada em vez da solução padrão.



Figura 14: Amostras da experiência C com adição de DNS, após aquecimento a  $100^\circ\text{C}$ .

As absorvâncias das soluções foram lidas a 540 nm. Um exemplo de curva de calibração é apresentado na Figura 15.

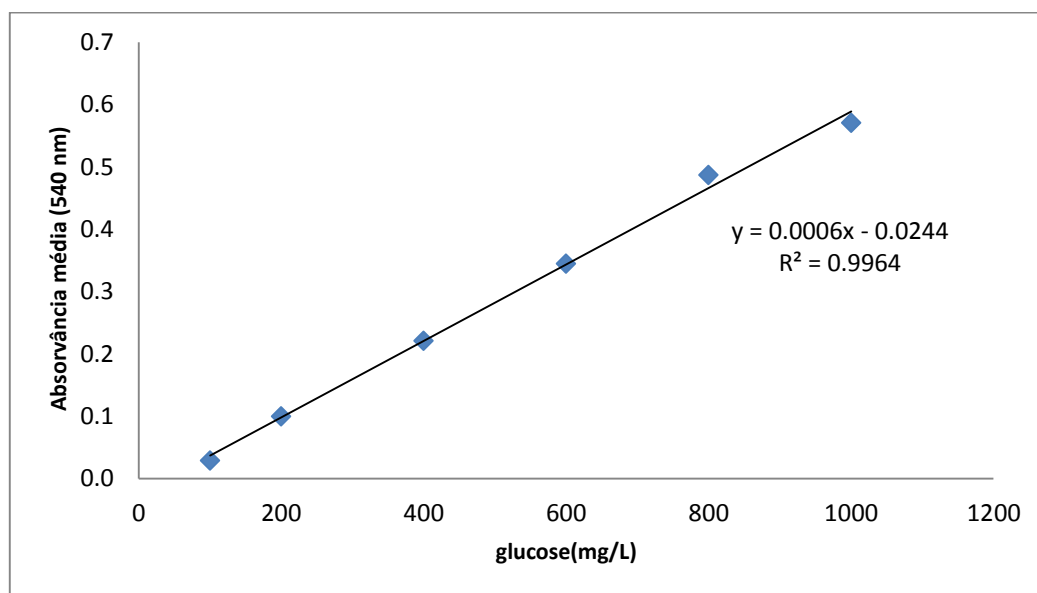


Figura 15: Recta de calibração da glucose pelo método de DNS.

Este método foi realizado para quantificar a glucose consumida durante as várias fermentações realizadas. Para isso, procedeu-se de igual modo como descrito na determinação da curva de calibração, substituindo-se a solução padrão pela amostra de extrato fúngico, obtido após a filtração.

A concentração de glucose em cada amostra foi determinada substituindo-se a absorvância medida para cada amostra, na curva de calibração.

### 3.2.3. Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos fúngicos

A avaliação da capacidade antibacteriana dos extractos foi realizada pelo método de difusão em agar. Utilizaram-se placas de *Petri* estéreis com Agar de *Mueller-Hinton* inoculadas com 100 µL do microrganismo teste *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Foram utilizadas culturas nocturnas de cada microrganismo teste. Após o espalhamento da suspensão das bactérias, deixou-se em repouso as placas de *Petri* durante 5 minutos, para que fosse possível a sua absorção no meio.

Numa primeira fase foram colocados, na placa de *Petri*, discos de papel de filtro de 6mm previamente impregnados com os extractos fúngicos resultantes de cada fermentação. Como controlo positivo de agente antimicrobiano foi usado o antibiótico Tetraciclina (30 µg/mL) e como controlo negativo o meio de cultura aplicado no desenvolvimento da experiência. Estes testes foram realizados a cada uma das amostras e em triplicado.

De seguida as placas de *Petri* foram colocadas numa incubadora durante cerca de 18 horas a 37°C. Após esse período a avaliação da capacidade antimicrobiana foi feita através do diâmetro dos halos de inibição, em mm formados (Figura 16).



**Figura 16: Método de difusão em Agar para avaliar a capacidade antibacteriana dos extratos fúngicos.**  
A – Antibiótico; M – meio de cultura; 4,5 e 6 – amostra dos extratos em triplicado.

A avaliação da capacidade antibacteriana dos extractos fúngicos foi realizada em todos os extractos obtidos sem qualquer tratamento e após concentradas num evaporador rotativo (Figura 17).

A concentração dos extractos num evaporador rotativo foi efectuada com o propósito de melhorar os resultados dos testes realizados pelo método de difusão de agar. Pretendia-se assim, com a concentração dos extractos aumentar os halos de inibição formados.

Este processo foi realizado num evaporador rotativo na posição 7, a 39 °C e sob vácuo. A redução de volume e consequentemente a concentração foi realizada até se obter um volume de cerca de 5 mL, o que correspondeu a uma amostra quatro vezes mais concentrada. Sendo a amostra testada em seguida em termos de capacidade antimicrobiana.

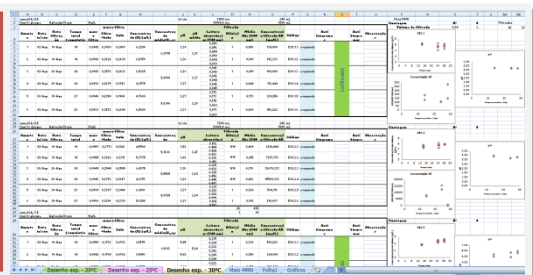


**Figura 17: Evaporador rotativo.**



## Capítulo 4

### Resultados experimentais e discussão



The image shows a screenshot of a Microsoft Excel spreadsheet. The spreadsheet is organized into several sections, each with a header row. The main data area contains multiple rows of numerical data. Some cells are highlighted in green, indicating specific data points or results. The spreadsheet appears to be a detailed record of experimental data, possibly related to the production and characterization of bioactive compounds mentioned in the footer.





## 4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

O principal objectivo do trabalho experimental realizado centrou-se na optimização das condições de crescimento e produção de compostos bioactivos de fungos endófitos da oliveira, nomeadamente da concentração de glucose, do pH, temperatura e agitação. Para se verificar quais as condições óptimas foram realizadas várias experiências, de acordo com uma metodologia factorial de desenho de experiências, e avaliada a actividade antibacteriana dos extractos fúngicos pelo método de difusão em agar. De seguida serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos.

No trabalho experimental foram inicialmente utilizados dois fungos de oliveira, o *Fusarium oxysporum* e o *Penicillium commune*, isolados na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Como já referido, a oliveira é uma planta que tem sido indicada como tendo propriedades terapêuticas, podendo estas estar associadas à produção de metabolitos secundários pelos fungos endofíticos das suas folhas. Apesar da importância da oliveira como planta medicinal, até ao momento, os fungos endofíticos a ela associados, só agora começam a ser caracterizados e estudados.

Após o crescimento em meio PDA dos dois fungos, optou-se por continuar o estudo apenas com o *Fusarium oxysporum* visto crescer e formar esporos mais rapidamente que o *Penicillium commune*.

Após a escolha do fungo, foi realizada uma fermentação em meio líquido para verificar o seu comportamento de crescimento nesse meio, o perfil de aumento de biomassa e consumo de substrato e também a possível produção de compostos com propriedades antibacterianas. Verificou-se que o fungo não crescia em *pellet* e por isso, quer o inóculo quer a quantificação da biomassa ao longo do tempo de fermentação era dificultada e não homogénea. Assim, optou-se por preparar o inóculo a partir dos esporos como descrito no Capítulo 3. O fungo crescia em meio PDA e posteriormente eram retirados os esporos e contados. As fermentações em meio líquido foram sempre iniciadas com um número semelhante de esporos.

Para ultrapassar a dificuldade na remoção de amostras representativas da biomassa formada ao longo do tempo, optou-se por preparar tantos matrizes quanto o número de amostras que se pretendia analisar. Por exemplo, numa fermentação onde se retiraram amostras em 3 dias diferentes e querendo efectuar amostras em triplicado de cada um desses dias, foram preparados 9 matrizes de 100 mL contendo 20 mL de meio de cultura. Os meios de cultura eram preparados nas mesmas condições e inoculados com a mesma suspensão e quantidade de esporos. As amostras correspondiam a 3 matrizes retirados no mesmo dia. Para quantificar a biomassa, pelo método do peso seco, o meio de cada matraz era filtrado.

Realizaram-se algumas fermentações em meio MMN para verificar o perfil de aumento de biomassa e consumo de substrato e também a possível produção de compostos com propriedades antibacterianas, cujos resultados se encontram na Figura 18.

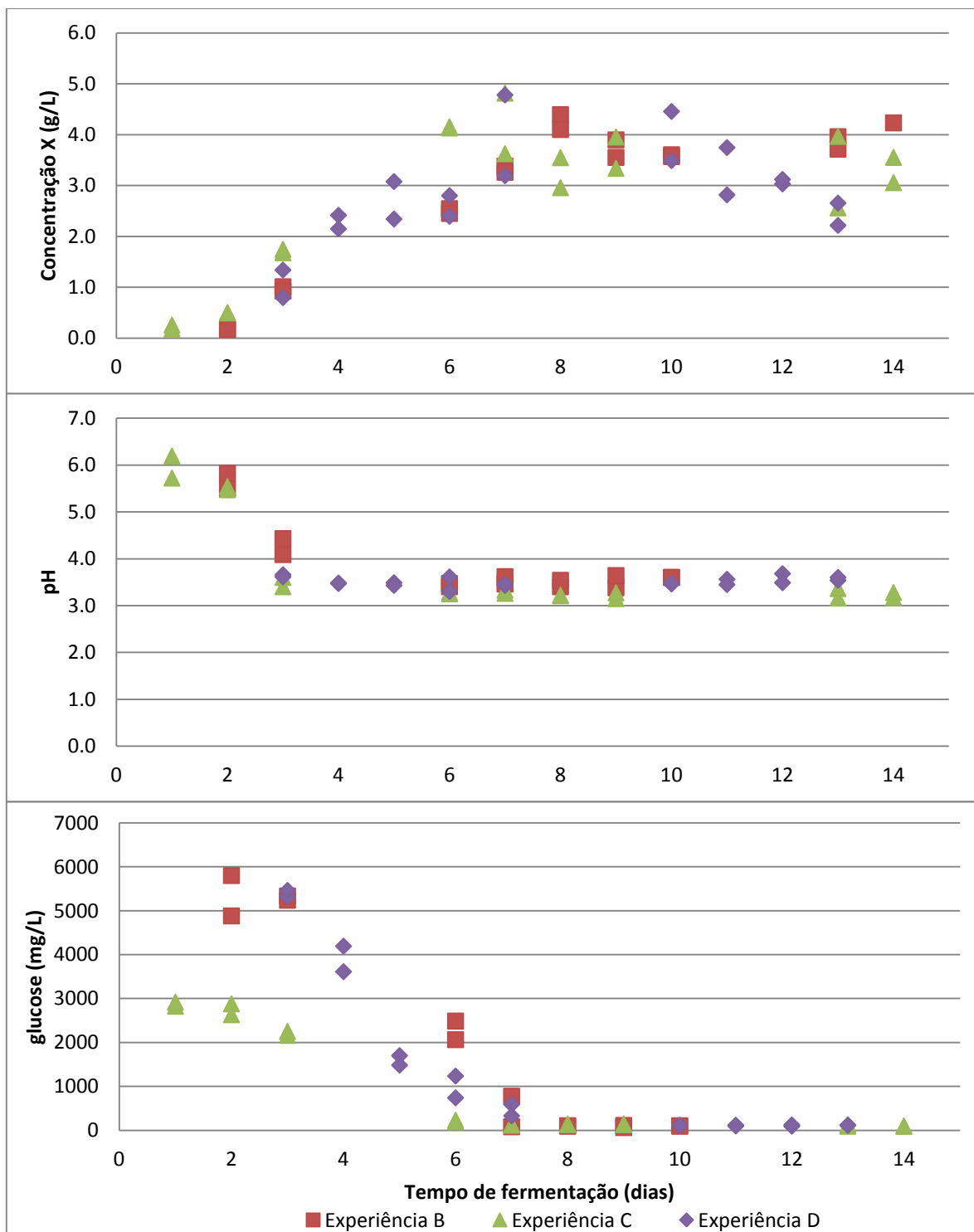


Figura 18: Variação da concentração de biomassa e de glucose e variação do pH em três fermentações a 25°C e 180 rpm.

Verificou-se que de um modo geral o perfil de concentração da biomassa, de glucose e pH se mantêm de fermentação para fermentação. Verificou-se ainda que, ao fim de 8 dias já não se observava aumento da concentração de biomassa uma vez que, a concentração de glucose disponível no meio de cultura é residual, não sendo suficiente para manter o crescimento do fungo. Observa-se ainda que o valor de pH sofre uma diminuição numa primeira fase da fermentação, o que vem ao encontro do esperado, uma vez que actividade microbiana nessa fase da fermentação pode provocar essa diminuição (Souza et al.; 2000), mantendo-se posteriormente constante.

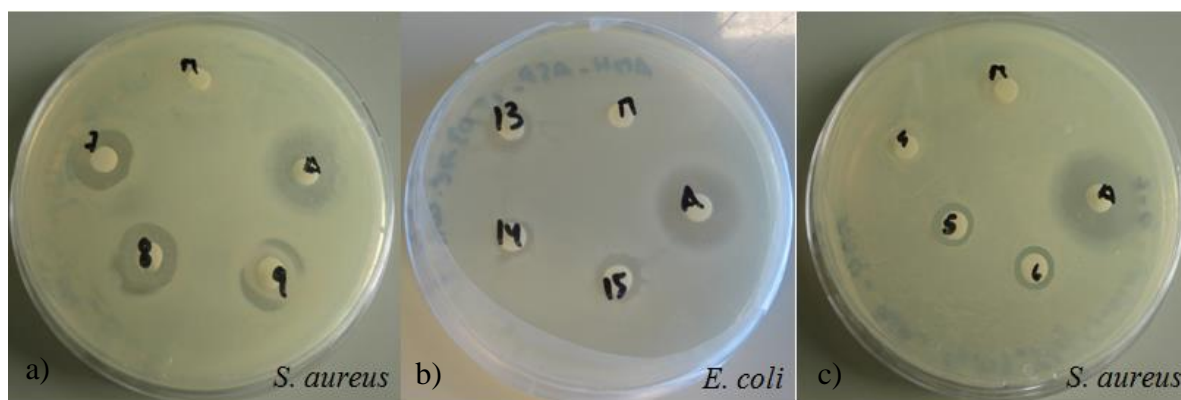
Após cada fermentação realizaram-se os ensaios para verificar se estavam a ser produzidos compostos com propriedades antimicrobianas. Para tal, utilizou-se o método de difusão em agar e como microrganismos teste foram utilizadas a bactéria *Gram* negativa *Escherichia coli* e a bactéria *Gram* positiva *Staphylococcus aureus*.

Nestes ensaios observou-se a formação de pequenos halos de inibição nos últimos dias de fermentação (Tabela 6 e Figura 19). No entanto, os resultados obtidos apontavam para uma concentração de compostos produzidos reduzida.

**Tabela 6:** Valores finais médios de concentração de biomassa, glucose, pH e halos de inibição das fermentações preliminares B, C e D.

Experiência	Condições de operação iniciais						$\overline{d_{\text{halo inibição}}}$ (mm)	
	Temperatura (°C)	Concentração inicial de glucose (g/L)	Agitação (rpm)	$[X]_{\text{média}}$ (g/L)	$\overline{pH}$	$[glucose]_{\text{média}}$ (g/L)	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
B	25	10,0	180	$8 \pm 1$	3,9	1,95	$10 \pm 4$	$8 \pm 1$
C	25	10,0	180	$3 \pm 2$	3,3	0,96	$9 \pm 2$	$9 \pm 1$
D	25	20,0	180	$3 \pm 1$	3,5	0,142	$6,9 \pm 0,7$	$8 \pm 1$

Na Figura 19 são apresentados como exemplo os resultados de 3 ensaios do método em difusão em agar para as três fermentações iniciais realizadas.



**Figura 19:** Antibiógramas das fermentações, a) B; b) C e c) D, com microrganismos teste *E.coli* e *S. aureus*.

Assim, os resultados das fermentações preliminares realizadas em meio MMN permitiram delinear as restantes experiências tendo em vista a optimização de crescimento do fungo e da produção de compostos com propriedades antibacterianas. Foram realizadas 17 experiências de acordo com o desenho experimental apresentado na Tabela 4. As variáveis avaliadas foram a temperatura (20, 25 e 30 °C), a agitação (80, 160, 240 rpm), o pH (5,5; 6,5 e 7,5), e a concentração inicial de glucose (1, 2 e 3%). Pretendeu-se verificar para além das condições óptimas, qual ou quais destas variáveis influenciam mais o crescimento e produção do fungo *Fusarium oxysporum*.

Foram retiradas amostras ao fim de 14, 24 e 28 dias, uma vez que se verificou nas fermentações iniciais que até aos 8 dias ainda se observava crescimento. Por outro lado, os compostos produzidos que têm sido descritos na literatura, com propriedades bioactivas são metabolitos secundários ((Lee, Lobkovsky, Liam, Strobel, & Clardy, 1995); (Petrini, 1996); (Posch, 2013)), pelo que a sua produção tem que ser independente do crescimento microbiano. Na literatura são também encontradas referências de trabalhos em que a purificação e caracterização dos produtos formados é conseguida ao fim de 28 dias de fermentação (Wang, 2012).

Para os ensaios de avaliação das propriedades antimicrobianas dos extractos, procedeu-se a uma evaporação prévia, de modo a concentrar os compostos possivelmente formados.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Condições iniciais de fermentação para o desenho experimental e respectivos valores finais médios.

Condições iniciais							$\overline{d}_{\text{halo inibição}}$ (mm)	
Temperatura (°C)	pH	glucose (g/L)	Agitação (rpm)	$[X]_{\text{média}}$ (g/L)	$\overline{pH}$	$[glucose]_{\text{média}}$ (g/L)	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
20	5,5	10	80	2,8 ± 0,4	3,4	0,27	7,0 ± 0,9	6,4 ± 0,7
20	5,5	30	80	3,4 ± 0,9	3,4	13,89	7,3 ± 1,0	6,6 ± 0,7
20	7,5	10	80	2,7 ± 0,3	4,6	0,57	8,4 ± 0,9	8,1 ± 0,9
20	7,5	30	80	3 ± 1	4,7	21,49	6,9 ± 0,9	6,6 ± 0,6
20	5,5	10	240	2,9 ± 0,3	3,8	0,15	6,9 ± 0,8	6,6 ± 0,7
20	5,5	30	240	5 ± 1	3,5	20,26	6,9 ± 0,9	6,4 ± 0,7
20	7,5	10	240	2,6 ± 0,5	5,8	0,49	7,7 ± 0,7	6,5 ± 0,6
20	7,5	30	240	5,4 ± 0,9	4,8	10,89	7,2 ± 0,9	6,6 ± 0,8
25	5,5	10	160	2,9 ± 0,9	4,2	113,58	8,3 ± 1,8	8,7 ± 1,8
25	5,5	20	160	5,4 ± 0,3	3,6	199,00	9,8 ± 1,3	9,1 ± 1,0
25	5,5	30	160	5,2 ± 0,9	3,4	2147,11	7,3 ± 0,6	8,5 ± 1,9
25	6,5	10	160	3,1 ± 0,8	5,2	105,11	7,5 ± 0,5	9,4 ± 2,4
25	6,5	20	160	4,6 ± 1,1	3,8	0,34	7,8 ± 1,3	7,9 ± 0,9
25	6,5	30	160	5,4 ± 1,7	3,5	771,25	9,3 ± 1,4	9,3 ± 1,6
25	7,5	10	160	3,4 ± 0,5	7,1	232,33	8,4 ± 2,0	8,0 ± 1,5
25	7,5	20	160	4,6 ± 0,3	4,0	338,03	8,9 ± 1,2	9,9 ± 0,8
25	7,5	30	160	4,2 ± 0,4	3,5	652,19	8,1 ± 1,3	8,3 ± 1,6

Tabela 7 (continuação): Condições iniciais de fermentação para o desenho experimental e respectivos valores finais médios.

Condições iniciais							$\overline{d_{halo\ inhibition}}$ (mm)	
Temperatura (°C)	pH	glucose (g/L)	Agitação (rpm)	$[X]_{média}$ (g/L)	$\overline{pH}$	$[glucose]_{média}$ (g/L)	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
30	5,5	10	80	$5,833 \pm 1$	3,3	0,17	$9,1 \pm 0,8$	$7,5 \pm 1,1$
30	5,5	30	80	$5,6 \pm 0,8$	3,4	7,41	$6,6 \pm 0,7$	$6,5 \pm 0,6$
30	7,5	10	80	$2,3 \pm 0,3$	5,6	0,39	$8,4 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,8$
30	7,5	30	80	$4 \pm 1$	4,7	11,50	$9 \pm 1$	$7,7 \pm 0,8$
30	5,5	10	240	$4 \pm 1$	3,3	2,62	$8,7 \pm 0,9$	$7,9 \pm 0,8$
30	5,5	30	240	$6 \pm 2$	3,3	12,27	$6,7 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,8$
30	7,5	10	240	$3 \pm 1$	5,3	0,50	$6,8 \pm 0,9$	$6,9 \pm 0,8$
30	7,5	30	240	$4 \pm 2$	4,5	10,65	$7,4 \pm 0,9$	$6,5 \pm 0,6$

Nestas fermentações, verificou-se que apesar de se terem evaporado os extractos tendo em vista a concentração dos possíveis compostos produzidos, não se observou uma inibição significativa dos microrganismos teste (Figura 20).

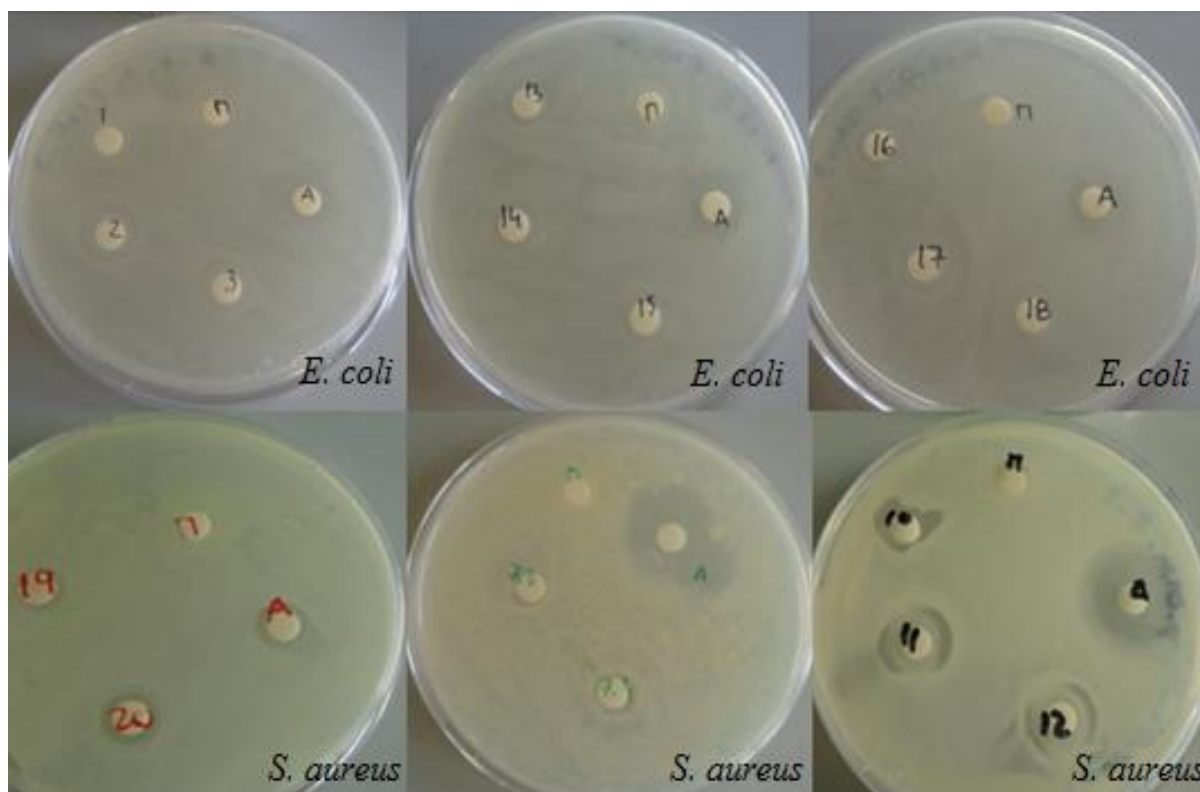


Figura 20: Antibiogramas das experiências do desenho experimental, com microrganismos teste *E.coli* e *S. aureus*.

Para avaliar o possível efeito de cada um dos 5 factores estudados no crescimento do fungo endofítico (avaliado através da determinação da biomassa final) e da actividade antimicrobiana dos extractos contendo possíveis compostos bioactivos inibidores do crescimento da *E. coli* e do *S. aureus* (estimado através da área do halo de inibição considerando um círculo cujo diâmetro foi medido), procedeu-se a uma análise de variância, a um nível de significância de 5%, considerando as possíveis interacções. Na Tabela 8 indicam-se os valores de prova (*P*) para cada factor individual e para as respectivas interacções.

Tabela 8: Valores de prova (*P*) para factores individuais e interacções.

Efeito/interacção	Valor de prova ( <i>P</i> )		
	Biomassa (g/L)	Área de inibição (mm <sup>2</sup> ) para a <i>E. coli</i>	Área de inibição (mm <sup>2</sup> ) para o <i>S. aureus</i>
Tempo de fermentação (A), dias	<0,0001 (*)	0,0051 (*)	0.0324 (*)
Temperatura (B), °C	<0,0001 (*)	<0,0001 (*)	<0,0001 (*)
pH (C)	<0,0001 (*)	0,0068 (*)	<0,0001 (*)
Concentração inicial da glucose (D), g/L	<0,0001 (*)	<0,0001 (*)	<0,0001 (*)
Velocidade de agitação (E), rpm	0.0012 (*)	<0,0001 (*)	<0,0001 (*)
A×B	<0,0001 (*)	0,0323 (*)	0.1152
A×C	0,0015 (*)	0,2903	0.2089
B×C	<0,0001 (*)	0,0639	0.0427 (*)
A×D	0.0047 (*)	0,9387	0.1490
B×D	0.2809	0,0420 (*)	0.0090 (*)
C×D	0.0480 (*)	<0,0001 (*)	0.6991
A×E	0.6038	0,1250	0.8048
B×E	<0,0001 (*)	0,0016 (*)	0.6664
C×E	0.0049 (*)	0,0004 (*)	<0,0001 (*)
D×E	<0,0001 (*)	0,2145	0.0822
A×B×C	0.0363 (*)	0,4587	0.0109 (*)
A×B×D	0.4665	0,1081	0.6341
A×C×D	0.0064 (*)	0,6550	0.4242
B×C×D	0.7876	<0,0001 (*)	<0,0001 (*)
A×B×E	0.0004 (*)	0,0006 (*)	0.1692
A×C×E	0.3457	0,0674	0.5339
B×C×E	0.0043 (*)	0,0004 (*)	0.0285 (*)
A×D×E	0.3503	0,3364	0.0251 (*)
B×D×E	0.0203 (*)	0,6439	0.0012 (*)
C×D×E	0.0597	0,3784	0.0003 (*)
A×B×C×D	0.1332	0,4333	0.6977
A×B×C×E	0.0437 (*)	0,4489	0.1706
A×B×D×E	0.8809	0,6866	0.2139
A×C×D×E	0.6462	0,3294	0.9572
B×C×D×E	0.0481 (*)	0,0702	0.0084 (*)
A×B×C×D×E	0.8953	0,8605	0.3883

(\*) Efeito/interacção estatisticamente significativo a um nível de significância de 5% ( $P<0.05$ )

Em virtude de existirem múltiplas interacções ( $A \times B$  a  $A \times B \times C \times D \times E$ ) estatisticamente significativas, para qualquer uma das variáveis analisadas (biomassa, halos de inibição da *E. coli* e do *S. aureus*) a análise deste tipo de desenho experimental torna-se mais complexo uma vez que os efeitos das interacções podem interferir nos possíveis efeitos dos factores principais (neste caso, A a E). Assim sendo, a existência de interacções significativas, obriga a comparar os grupos definidos pelos níveis dos factores principais bem como a comparar os grupos definidos pelas interacções dos factores (ou seja, grupos que resultem dos cruzamentos dos níveis dos factores (Maroco, 2007). Este tipo de análise, pode ser realizada transformando o desenho ANOVA a 5 factores numa ANOVA a um factor onde os níveis do novo factor único resultam do cruzamento dos níveis dos 5. Deve-se, contudo, realçar que neste caso o cruzamento dos 5 factores resulta num elevado número de comparações múltiplas, pelo que os testes a todas as comparações múltiplas possíveis podem produzir um efeito de redundância inflacionando a probabilidade de ocorrência de erro do tipo I (detectar a significância de um efeito mas este não existe, i.e., ocorrência de falsos positivos).

Assim sendo, por uma questão prática e de simplicidade, optou-se por basear a discussão nos resultados da ANOVA a 5 factores, apenas para os efeitos principais, não considerando as interacções significativas. Quando um dado efeito é estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ), avaliou-se a existência de diferenças significativas entre os níveis desse factor através do teste de comparações múltiplas Tukey HSD (a um nível de confiança de 5%).

Deste modo, e por análise da Tabela 8, verifica-se que os 5 factores principais avaliados têm um efeito significativo na biomassa final, isto é, no crescimento do fungo endofítico *Fusarium oxysporum*. Os testes de comparações múltiplas (Tukey HSD) efectuados para cada efeito principal permitiram ainda concluir que:

**a) Condições de crescimento do fungo *Fusarium oxysporum***

- A biomassa obtida ao fim de 14 dias de fermentação é menor do que a obtida após 24 ou 28 dias ( $P < 0,0001$  e  $P = 0,0026$ , respectivamente) sendo que dos 24 para 28 dias verifica-se um ligeiro decréscimo da biomassa embora não seja estatisticamente significativo ( $P = 0,3439$ ).
- As fermentações realizadas a 20°C conduziram a um menor crescimento do fungo endofítico (menor biomassa final) do que as realizadas a 25°C ( $P = 0,0007$ ) ou a 30°C ( $P < 0,0001$ ). Entre 25°C e 30°C as diferenças observadas não são estatisticamente significativas ( $P = 0,4970$ ) embora se assista a um ligeiro decréscimo da biomassa para a temperatura superior.
- De entre os valores de pH inicial estudados verifica-se o crescimento do fungo é favorecido para o pH inicial de 5,5 embora de um ponto de vista estatístico apenas se tenham encontrado diferenças significativas entre os ensaios a pH 5,5 e pH 7,5 ( $P < 0,0001$ ).
- Quanto à concentração inicial de glucose constatou-se que o crescimento do fungo é significativamente maior para uma concentração de 30 g/L do que a 10 g/L ( $P < 0,0001$ ), sendo semelhante a biomassa alcançada a 10 e 20 g/L ou a 20 e 30 g/L ( $P = 0,1015$ ).
- A agitação máxima estudada (240 rpm) parece ser a que favorece mais o crescimento do fungo endofítico, sendo que se observa uma maior concentração de biomassa nas fermentações realizadas a 240 rpm comparativamente com as realizadas a 80 rpm ( $P = 0,0033$ ),

embora não se tenham encontrado evidências de diferenças significativas entre os valores de biomassa obtidos a 80 e 160 rpm ou a 160 e 240 rpm ( $P=0,6980$ ).

Por fim, do estudo realizado pode inferir-se que de entre as condições estudadas as mais adequadas para o crescimento do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* são: 25 °C (ou 30 °C), pH de 5,5 (ou 7,5), concentração inicial de glucose de 30 g/L (ou 20 g/L) e uma agitação 240 rpm (ou 160 rpm).

**b) Actividade antimicrobiana – área de inibição do crescimento da *E. coli***

- A actividade antimicrobiana é menor ao fim de 14 dias de fermentação do que após 24 ou 28 dias, embora apenas se verifiquem diferenças estatisticamente significativas entre os 14 e os 28 dias de fermentação ( $P=0,0034$ ). Embora não haja evidências estatísticas ( $P=0,2241$ ), dos resultados obtidos pode inferir-se que os extractos recolhidos após 28 dias apresentam uma maior actividade antimicrobiana.

- Os extractos recolhidos das fermentações realizadas a 20 °C apresentam uma menor actividade antimicrobiana (menores áreas de inibição do crescimento da *E. coli*) comparativamente com os recolhidos das fermentações realizadas a 25 °C ( $P=0,0082$ ) ou a 30 °C ( $P<0,0001$ ). Entre 25 °C e 30 °C as diferenças observadas não são estatisticamente significativas ( $P=0,9175$ ) embora se assista a um ligeiro decréscimo da actividade antimicrobiana para a temperatura superior.

- De entre os valores de pH inicial estudados verifica-se que a actividade antimicrobiana é maior para as fermentações cujo pH inicial era de 7,5 embora de um ponto de vista estatístico apenas se tenham encontrado diferenças significativas entre os ensaios a pH 5,5 e pH 7,5 ( $P=0,0184$ ).

- Quanto à concentração inicial de glucose constatou-se que a actividade antimicrobiana é inferior para os extractos recolhidos das fermentações cuja concentração inicial de glucose era de 30 g/L embora o estudo realizado apenas permita afirmar que essa diferença é significativa entre 30 g/L e 10 g/L ( $P<0,0001$ ), sendo estatisticamente similar entre 10 e 20 g/L ou 20 e 30 g/L ( $P=0,3438$ ). Contudo, analisando os resultados obtidos parece plausível apontar a concentração inicial de glucose de 10 g/L como a que mais favorece a actividade antimicrobiana.

- Quanto à velocidade de agitação, os resultados indiciam que quanto maior é a velocidade de agitação menor é a actividade antimicrobiana dos extractos obtidos. No entanto, de um ponto de vista estatístico esta conclusão apenas é corroborada pelos valores obtidos a 80 e 240 rpm ( $P<0,0001$ ).

Assim sendo, do estudo realizado pode inferir-se que de entre as condições estudadas as mais adequadas para a obtenção de extractos com maior poder antimicrobiano relativamente à *E. coli* são: 25 °C, pH inicial de 7,5, concentração inicial de glucose de 10 g/L e uma agitação 80 rpm.

**c) Actividade antimicrobiana – área de inibição do crescimento da *S. aureus***

- A actividade antimicrobiana é menor ao fim de 14 dias de fermentação do que após 24 ou 28 dias, embora apenas se verifiquem diferenças estatisticamente significativas entre os 14 e os



28 dias de fermentação ( $P=0,0251$ ). Embora não haja evidências estatísticas ( $P>0,2726$ ), dos resultados obtidos pode inferir-se que os extractos recolhidos após 28 dias apresentam uma maior actividade antimicrobiana.

- Os extractos recolhidos das fermentações realizadas a 20 °C apresentam uma menor actividade antimicrobiana (menores áreas de inibição do crescimento do *S. aureus*) comparativamente com os recolhidos das fermentações realizadas a 25 °C ( $P<0,0001$ ) ou a 30 °C ( $P<0,0001$ ). Mais ainda, os extractos recolhidos de fermentações realizadas a 25 °C apresentam uma maior actividade antimicrobiana do que os recolhidos em fermentações a 30 °C ( $P<0,0001$ ).

- De entre os valores de pH inicial estudados verifica-se a actividade antimicrobiana é maior para as fermentações cujo pH inicial era de 7,5 embora de um ponto de vista estatístico apenas se tenham encontrado diferenças significativas entre os ensaios a pH 5,5 e pH 7,5 ( $P<0,0001$ ).

- Quanto à concentração inicial de glucose constatou-se que a actividade antimicrobiana dos extractos decresce à medida que a concentração inicial de glucose nas fermentações aumenta, embora o estudo realizado apenas permita afirmar que essa diferença é significativa entre 30 g/l e 10 g/L ( $P<0,0001$ ), sendo estatisticamente similar entre 10 e 20 g/L ou 20 e 30 g/L ( $P=0,1581$ ). Contudo, analisando os resultados obtidos parece plausível mais uma vez seleccionar a concentração inicial de glucose de 10 g/L como a que mais favorece a actividade antimicrobiana.

- Quanto à velocidade de agitação, os resultados indiciam que quanto maior é a velocidade de agitação menor é a actividade antimicrobiana dos extractos obtidos. No entanto, de um ponto de vista estatístico esta conclusão apenas é corroborada pelos valores obtidos a 80 e 240 rpm ( $P<0,0001$ ).

Assim sendo, do estudo realizado pode inferir-se que de entre as condições estudadas as mais adequadas para a obtenção de extractos com maior poder antimicrobiano relativamente ao *S. aureus* são as mesmas que as identificadas para a *E.coli*: 25 °C, pH inicial de 7,5, concentração inicial de glucose de 10 g/L e uma agitação de 80 rpm.

Em conclusão, deste estudo pode afirmar-se que as condições de fermentação que potenciam a obtenção de extractos do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* com maior actividade antibacteriana, para bactérias Gram negativa (e.g., *E. coli*) e Gram positiva (e.g., *S. aureus*) são as mesmas (25 °C, pH=7,5, 10 g/L de concentração inicial de glucose e velocidade de agitação de 80 rpm). É ainda de realçar que, algumas destas condições não são as que permitem um maior crescimento do fungo endofítico (maior biomassa final: 25 °C, pH=5,5 ou 7,5, concentração inicial de glucose de 30 g/L e uma velocidade de agitação de 240 rpm). Em especial é de referir que a concentração de glucose inicial e a velocidade de agitação parecem ter efeitos contrários, isto é, quanto maiores, maior é o crescimento do fungo mas menor é a actividade antibacteriana observada. Deste modo, especial atenção deve ser dada a estes 2 factores. Convém no entanto realçar que, em virtude de existirem interações estatisticamente significativas cujo efeito não foi avaliado, as conclusões extraídas devem ser usadas com precaução.

Numa tentativa de reduzir o número de factores a estudar, de modo a tentar perceber a possível influência das interações entre efeitos principais, fixaram-se 2 factores, temperatura e velocidade de agitação, em 25°C e 160 rpm, respectivamente, tentando seleccionar as condições que permitissem simultaneamente obter um crescimento aceitável do fungo endofítico e a obtenção de extractos finais de fermentação com actividade antibacteriana. Por outro lado, por questões de tempo, optou-se por analisar os resultados a um tempo de fermentação de 14 dias. Os efeitos considerados para estudo foram o pH inicial do meio de fermentação (5,5; 6,5 e 7,5) e a concentração inicial de glucose (10, 20 e 30 g/L). Deste modo, o desenho experimental foi reduzido sendo os resultados analisados por recurso a uma ANOVA a 2 factores com interacção. Na Tabela 9 apresentam-se os resultados obtidos para as 3 variáveis analisadas: biomassa e actividade antibacteriana dos extractos fermentativos em relação à *E. coli* e ao *S. aureus*. Nessas experiências obtiveram-se os resultados apresentados na tabela que se segue, para 7 e 14 dias de fermentação.

**Tabela 9: ANOVA a 2 factores com interacção: avaliação da concentração de biomassa final do fungo endofítico e actividade antibacteriana relativamente à *E. coli* e ao *S. aureus*.**

Efeito/interacção	Valor de prova (P)		
	Biomassa (g/L)	Área de inibição (mm <sup>2</sup> ) para a <i>E. coli</i>	Área de inibição (mm <sup>2</sup> ) para o <i>S. aureus</i>
pH (C)	0,0187 (*)	0,9144	0,1591
Concentração inicial da glucose (D), g/L	0,0001 (*)	0,0137 (*)	0,0399 (*)
C×D	0,0265 (*)	<0,0001 (*)	0,0214 (*)

(\*) Efeito/interacção estatisticamente significativo a um nível de significância de 5% ( $P < 0.05$ )

A análise dos resultados da ANOVA a 2 factores parece indicar que no caso da actividade antibacteriana o pH inicial do meio de fermentação não é estatisticamente significativo ( $P \geq 0,1591$ ), sendo este efeito apenas relevante para o crescimento do fungo endofítico ( $P = 0,0187$ ). Por outro lado, a concentração inicial de glucose afecta significativamente tanto o crescimento do fungo ( $P = 0,0001$ ) como as actividades antimicrobianas dos extractos finais ( $P \leq 0,0399$ ). No entanto, uma vez que apenas 2 factores foram considerados optou-se por analisar graficamente o tipo de interacção obtido entre os efeitos principais, em alternativa ao teste de comparações múltiplas anteriormente utilizado (Tukey HSD), em virtude da existência de interacções poder mascarar o real efeito de cada factor principal.

A Figura 21 apresenta o estudo gráfico da interacção entre o pH e a concentração de glucose para cada uma das variáveis avaliadas (biomassa, actividade antibacteriana em relação à *E. coli* e ao *S. aureus*).

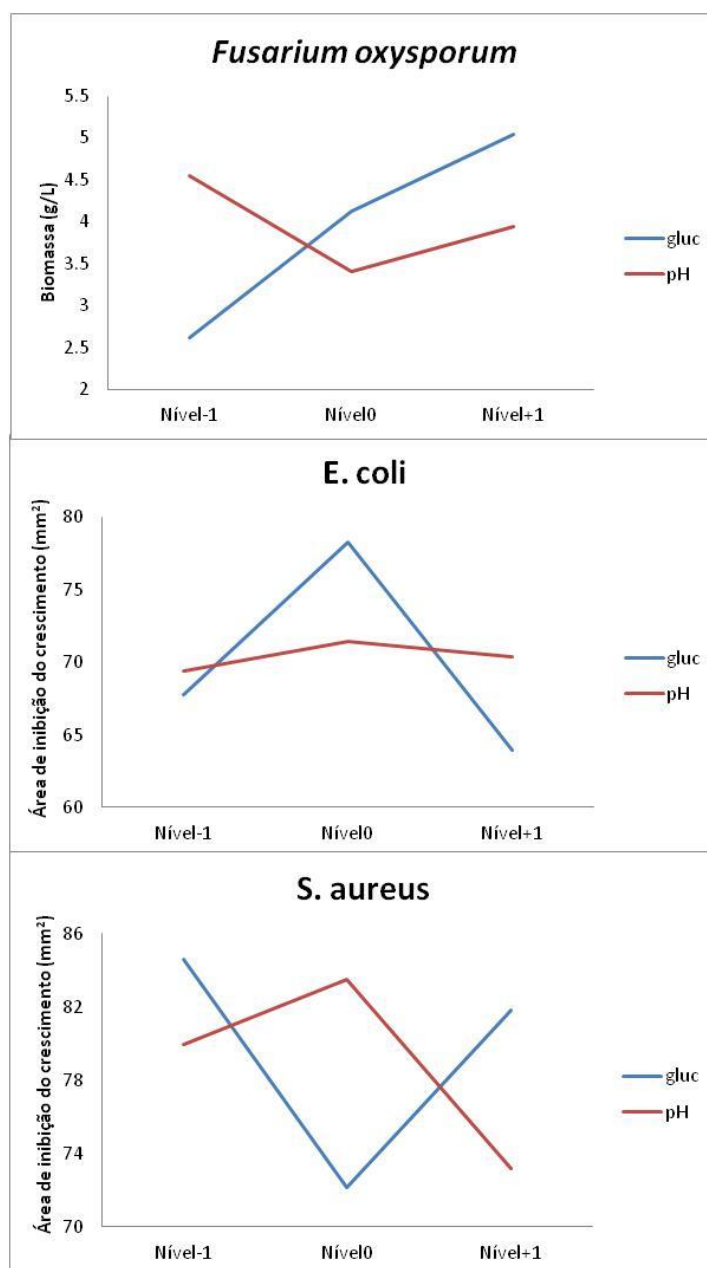


Figura 21: Análise gráfica das interações estatisticamente significativas entre os efeitos principais (pH e concentração inicial de glucose) para a biomassa e actividades antibacterianas relativamente à *E. coli* e ao *S. aureus*.

Como se pode verificar da análise da Figura 21, para as 3 variáveis os efeitos não são aditivos pelo que não devem ser considerados individualmente. Mais ainda pode inferir-se pela análise dos gráficos que o crescimento do fungo é favorecido pelos valores máximos de pH e concentração de glucose (pH=7,5 e 30 g/L de glucose), a actividade antibacteriana para a *E. coli* parece ser favorecida pelos níveis intermédios dos 2 factores (pH=6,5 e 20 g/L de glucose) e, por fim, a actividade antibacteriana para o *S. aureus* é favorecida pelos valores mínimos dos 2 factores (pH=5,5 e 10 g/L de glucose). Estas conclusões estão parcialmente concordantes com as extraídas do estudo simultâneo dos 5 factores avaliados (tempo,

temperatura, pH, concentração de glucose e velocidade de agitação), validando a opção de análise dos resultados da ANOVA a 5 factores.

Por fim, para estes últimos ensaios, em condições fixas de temperatura (25°C) e de velocidade de agitação (160 rpm) aplicou-se um teste t-Student de variâncias desiguais com correcção de Welch, a um nível de significância de 5%, para tentar avaliar para qual das bactérias (*E. coli* ou *S. aureus*) os extractos apresentavam uma maior actividade antibacteriana. Os resultados obtidos permitem concluir que os possíveis compostos bioactivos presentes nesses extractos conduzem a uma maior área de inibição para o *S. aureus* ( $79 \pm 19 \text{ mm}^2$ ) do que a obtida para a *E. coli* ( $70 \pm 22 \text{ mm}^2$ ), sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $P=0,0124$ ). Deste resultado, embora preliminar, pode-se inferir que os compostos bioactivos produzidos pelo fungo endófito *Fusarium oxysporum* possuem uma maior actividade antibacteriana relativamente a bactérias Gram positivo.

No decorrer das várias fermentações realizadas observou-se que o fungo *Fusarium oxysporum* apresentou diversas características morfológicas, alterando-se de fermentação para fermentação, como se pode observar na Figura 22



Figura 22: Amostras recolhidas ao longo do processo fermentativo no desenho experimental.

Este facto, pode ter influenciado os resultados obtidos, visto que a sua alteração morfológica pode também ter influenciado os metabolitos produzidos.

Esta observação vem ao encontro do que é descrito por outros autores (Yu, et al., 2010) e como sendo uma das dificuldades na utilização destes microrganismos a nível industrial (Kusari, Singh, & Jayabaskaran, 2014). Nos vários ensaios realizados para avaliar a actividade antibacteriana dos extractos fúngicos não se verificou uma inibição significativa dos m.o testes utilizados. Isso poderá dever-se ao facto de nestas condições de fermentação em meio líquido o fungo não produzir compostos com essas características. Por outro lado, não foi verificado se os compostos com poder antimicrobiano estariam a ser produzidos intracelularmente, não passando para o meio de fermentação.

Para verificar essa possibilidade dever-se-ia ter analisado o micélio, como descrito por outros autores (Shweta, et al., 2012).

Após a conclusão deste trabalho experimental e da análise dos resultados obtidos, considera-se que este estudo é uma abordagem preliminar da fermentação em meio líquido de fungos endófitos para produção de metabolitos bioactivos, podendo contribuir para o estabelecimento de estratégias para a sua optimização.



## Capítulo 5

### Conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros







## 5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

### 5.1 Conclusões gerais

É reconhecido e crescente o interesse em plantas medicinais, nomeadamente dos microrganismos que estabelecem com elas associações mutualistas por se acreditar que algumas propriedades atribuídas a essas plantas possam estar relacionadas com a produção de metabolitos desses microrganismos. É disso exemplo, a utilização da oliveira para fins terapêuticos devido às propriedades farmacológicas das suas folhas, descritas como anti-arrítmicas, espasmolíticas, imuno-estimulantes, cardioprotector, hipotensor, antihiperglicémico, antimicrobiano e anti-inflamatório (Mahjoub et al., 2011). Contudo, apesar da importância da oliveira como planta medicinal, até ao momento, os fungos endofíticos a ela associados, só agora começam a ser caracterizados e estudados.

É neste âmbito, que o trabalho descrito se insere, pretendendo ser um contributo para o estudo, aplicação e caracterização de metabolitos bioactivos produzidos pelo fungo endófito *Fusarium oxysporum* isolados da oliveira. De entre os resultados obtidos convém evidenciar as seguintes conclusões:

No decorrer das várias fermentações realizadas destaca-se o facto do fungo *Fusarium oxysporum* ter apresentado diversas características morfológicas, alterando-se de fermentação para fermentação. Esta alteração pode ter influenciado os resultados obtidos, visto que é descrito na literatura que alterações morfológicas levam a alterações do crescimento e do metabolismo dos fungos (Yu et al., 2012; Posh et al., 2013; Kusari et al., 2014).

As condições que favorecem o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* i. e., maior concentração de biomassa final, são: 25 °C, pH 5,5 ou 7,5, concentração inicial de glucose de 30 g/L e uma velocidade de agitação de 240 rpm.

Relativamente à produção de compostos com propriedades antibacterianos, a sua produção parece ser favorecida quando as condições de fermentação são: 25 °C, pH 7,5, concentração inicial de glucose de 10 g/L e velocidade de agitação de 80 rpm. Assim, uma observação importante a fazer é o facto de, quanto maior for a concentração de glucose inicial e a velocidade de agitação, maior o crescimento do fungo, contudo existe uma menor actividade antibacteriana. Deste modo, conclui-se que estes dois factores são importantes no processo de crescimento e produção de metabolitos. Contudo, houve interações estatisticamente significativas cujo efeito não foi avaliado.

Por análise dos resultados obtidos da capacidade antimicrobiana, concluiu-se que os possíveis compostos formados têm actividade antimicrobiana mais efectiva contra as bactérias *Gram* positivas. Contudo, mais estudos terão que ser realizados, uma vez que a concentração dos metabolitos formados foi muito baixa e que inviabilizou a sua purificação e caracterização. A baixa concentração de metabolitos observada poder-se-á dever ao facto de

estes não estarem a ser excretados para o meio de fermentação, mantendo-se no micélio ou sendo voláteis. Por outro lado, e uma vez que apenas se variou a concentração de glucose na composição do meio de cultura, também pode ter influenciado a quantidade de compostos formados a falta de alguns aminoácidos, vitaminas e outras fontes de azoto.

## 5.2 Sugestões para trabalho futuro

Os resultados obtidos neste trabalho deixam em aberto linhas para prosseguir a investigação e aplicação das estratégias apresentadas. Assim, de seguida, apresentam-se algumas sugestões de trabalho futuro que, se por um lado poderão complementar o trabalho realizado, por outro poderão ser indicações para novas linhas de investigação que conduzam a uma melhoria do desempenho de produção dos processos fermentativos de fungos endófitos.

Visto estar descrito que as interacções com a planta hospedeira tem um papel preponderante no metabolismo do fungo endófito, seria interessante verificar como a presença de extractos de oliveira influencia o crescimento e produção do fungo *Fusarium oxysporum*. Por outro lado, dever-se-ia também proceder a uma optimização da composição do meio de cultura, nomeadamente, da concentração de vitaminas, de aminoácidos, outras fontes de azoto e outras fontes de carbono.

Seria conveniente avaliar o crescimento do fungo em fermentações contínuas ou semi-contínuas, onde se pudesse estipular duas fases de fermentação, uma primeira fase que favorecesse o crescimento do fungo e uma fase posterior optimizada para a produção de metabolitos.

A pesquisa de compostos biologicamente activos poderá ser alargada não só ao extracto fúngico do meio de cultura, mas também aos compostos extraídos do micélio dos compostos voláteis que poderão estar a ser excretados para a atmosfera.

Por fim, seria pertinente realizar novos ensaios de avaliação das propriedades antimicrobianas nomeadamente com leveduras e fungos filamentosos.

## Referências Bibliográficas





## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agusta, A., Wulansar, D., Praptiwi, Nurkanto, A., & Fathoni, A. (2014). Biotransformation of Protoberberine Alkaloids by the Endophytic Fungus Coelomycetes AFKR-3 Isolated from Yellow Moonshed Plant (*Archangelisia flava* (L.) Merr.). *Procedia Chemistry* , 13, pp. 38-43.
- Alvin, A., Miller, K., & Neilan, B. A. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research* , 169, pp. 483-49.
- Appelberg, R., & Silva, N. (1998). *Microbiologia* (1ª Ed. ed., Vol. 1). Portugal, Lisboa: Lidel.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* , 21(2), pp. 51-66.
- Arnold, A., Maynard, Z., & Gilbert, G. (Dezembro de 2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol. Res.* , 105, pp. 1502-1507.
- Arnold, A., Maynard, Z., Gilbert, G., Coley, P., & Kursan, T. (2000). Are tropical endophytic fungi hyperdiverse? *Ecology Letters* , 3, pp. 264-268.
- Azevedo, C. (2005). *Biologia Celular e Molecular* (4ª Ed. ed.). Portugal, Lisboa, Porto: Lidel.
- Caruso, M., Colombo, A., Fedeli, L., Pavesi, A., Quarosi, S., Saracchi, M., et al. (2000). Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Annals of Microbiology* , 50, pp. 3-13.
- Chithra, S., Jasim, B., Sachidanandan, P., Jyothis, M., & Radhakrishnan, E. (2014). Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine* , 21, pp. 534-540.
- de Bary, A. (1866). *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten. Hofmeister's handbook of physiological botany* (Vol. II). Leipzig, Germany.
- Demain, A. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiology Biotechnology* , 52, pp. 455-463.
- Devaraju, R., & Satish, S. (13 de Novembro de 2010). Endophytic fungi: "Trapped" or "hidden" store houses of bioactive compounds within plants: A Review. *Journal of Pharmacy Research* , 3, pp. 2986-2989.
- Eyberger, A., Dondapati, R., & Porter, J. (2006). Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* , 69, pp. 1121-1124.
- Finlay, R. D. (2007). Fungal endophytes in forest, woody, plants and grass land ecosystems: diversity, functional ecology, evolution. *Fungal Biology Reviews* , 21, pp. 49-50.
- Gupte, M., Kulkarni, P., & Ganguli, B. (2002). Antifungal antibiotics. *Applied microbiology and biotechnology* , 58(1), pp. 46-57.
- Huang, Q., An, H., Song, H., Mao, H., Shen, W., & Dong, J. (2014). *Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant Kadsura angustifolia*, *Research in Microbiology*. Obtido em 2014, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.004>

- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* , 33, pp. 163-173.
- Jalgaonwala, R. E., Mohite, B. V., & Mahajan, R. T. (2011). A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *J Microbiol Biotechnol Res* , 1(2), pp. 21-32.
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., & Dhar, M. K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev* , 11, pp. 487-505.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hückelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides?. *Current opinion in plant biology*. 9(4), pp. 358-363.
- Kusari, S. e. (2012). *Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites progress, challenges and opportunities*. (I. Metabolomics, Ed.) U. Roessner (Ed.).
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology* , 19, pp. 792-798.
- Kusari, S., Lamshoft, M., & Spiteller, M. (2009). *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J. Appl. Microbiol.* , 107, pp. 1019–1030.
- Kusari, S., Lamshoft, M., Zuhlke, S., & Spiteller, M. (2008). An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. Nat. Prod.* , 71, pp. 159–162.
- Kusari, S., Singh, S., & Jayabaskaran, C. (2014). Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in biotechnology* , 32(6), pp. 297-303.
- Kusari, S., Verma, V., Lamshoft, M., & Spiteller, M. (2012). An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* , 28, pp. 1287–1294.
- Kusari, S., Zuhlke, S., & Spiteller, M. (2009). An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J. Nat. Prod.* , 72, pp. 2–7.
- Kusari, S., Zuhlke, S., & Spiteller, M. (2011). Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* , 74, pp. 764–775.
- Kusari, S., Zuhlke, S., Kosuth, J., Cellarova, E., & Spiteller, M. (2009). Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* , 72, pp. 1825–1835.
- Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* , 52(3), pp. 197-205.
- Lee, J., Lobkovsky, E., Liam, N., Strobel, G., & Clardy, J. (1995). Subglutinol A and subglutinol B immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *Journal of Organic Chemistry* , 60.
- Li, Y. S. (2005). Anti-Helicobacter pylori substances from endophytic fungal cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 21, pp. 553-558.
- Li, Y., Shan, T., Mou, Y., Li, P., Zhao, J., Zhao, W., et al. (26 de Março de 2012). Enhancement of Palmarumycin C12 and C13 Production in Liquid Culture of the Endophytic Fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 by Oligosaccharides from Its Host Plant *Dioscorea zingiberensis*. *molecules* , 17.

- Li, Y., Strobel, G., Harper, J., Lobkovsky, E., & Clardy, J. (2000). Cryptocin, a potent tetramic antimycot from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic Letters* , 23, pp. 767-770.
- Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S., & Wang, C. (28 de Novembro de 2012). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BioMed Central* , 12, pp. 238-250.
- Lodge, D., Fisher, P., & Sutton. (1996). Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* , 88, pp. 733-738.
- Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrate Polymers* , 97, pp. 627–634.
- Mahjoub, C., Khemiss, M., Dhidah, M., Dellaï, A., Bouraoui, A., & Khemiss, F. (2011). Chloroformic and methanolic extracts of *Olea europaea* L. leaves present anti-Inflammatory and analgesic activities. *ISRN pharmacology* , 2011.
- Maroco, J. (2007). *Análise estatística – com utilização do SPSS* (3ª ed.). (Sílabo, Ed.) Lisboa, Portugal.
- Ming-Jen, C., Ming-Der, W., Hiromasa, Y., Yung-Shun, S., Ih-Sheng, C., Gwo-Fang, Y., et al. (2012). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. *Phytochemistry Letters* , 5, pp. 467-472.
- Mohanta, J., Tayung, K., & Mahapatra, U. (2008). Antimicrobial potenciales of endophytic fungi inhabiting three Ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve. *The Internet Journal of Microbiology* , 5 (2).
- Ownley, B., Gwinn, K., & Vega, F. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* , 55, p. 113.
- Pereira, E. S.-N.-A. (2013). A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiology Research* , pp. 1-5.
- Peters, S., Dammeyer, B., & Schulz, B. (s.d.). Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to an endophytic and a pathogenic fungus. *Symbiosis* , 25, pp. 193-211.
- Petrini, O. (1996). Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. *APS Press* , 67, pp. 87-100.
- Posch, A. e. (2013). Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends Biotechnology* , 31, pp. 37–44.
- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J., & Mercado-Blanco, J. (Agosto de 2011). Root Hairs Play a Key Role in the Endophytic Colonization of Olive Roots by *Pseudomonas* spp. with Biocontrol Activity. *Microb. Ecol.* , 62, pp. 435-445.
- Puri S.C., N. A.-U.-H. (2006). The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J. Biotechnol* , 122, pp. 494-510.
- Puri, S., Verma, V., Amna, T., Qazi, G., & Spiteller, M. (2005). An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat.Prod.* , 68, pp. 1717–1719.
- Radic, N. S. (2012). Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine* , pp. 1270-1284.

- Radić, N., & Štrukelj, B. (2012). Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine* , 19(14), pp. 1270-1284.
- Ramasamy, K. L. (2010). Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. *Phytotherapy Research* , pp. 640-643.
- Raviraja, N., Maria, G., & Sridhar, K. (2006). Antimicrobial Evaluation of Endophytic Fungi Enhabiting Medicinal plants of the Western Ghats of India. *Eng. Life Sci* , 6, pp. 515-520.
- Rodriguez, R., White Jr, J., Arnold, A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 182(2), pp. 314-330.
- Rowan, D. (1993). Lolitrems, peramine and paxiline: Micotoxins of the ryegrass/endophyte interation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* , 44.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., & Rommert, A. (Setembro de 2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* , 106, pp. 996-1004.
- Shu, R. W. (2004). Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. pp. 667-673.
- Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B., Priti, V., Mohana, K. P., Ravikanth, G., et al. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from Apodytes dimidiata E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry* , 71, pp. 117-122.
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* , 260, pp. 214-216.
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanea* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* , 260.
- Strobel, G., Hess, W., Baird, G., Ford, E., Li, J., & Sidhu, R. (2001). *Stegoderium kukenani* gen. et. sp. nov. an endophytic taxol prodution fungus from the Ronaima and Kukenan tepuis of Venezuela. *Mycotaxon* , 78.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R., & Hess, W. (1996). Taxol from *pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *taxus wallachiana*. *Microbiology* , 142, pp. 435-440.
- Sun, Z. Z. (2011). Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massrison* sp. *Phytomedicine* , pp. 859-862.
- Suryanarayanan, T. V. (2001). Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity* , pp. 155-161.
- Wang, Y. X. (2012). Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine* , pp. 364-368.
- WHO. (2014). World Health Organization. *World Health Statistics* . Report.
- Xie, X. G., & Dai, C. C. (2015). Degradation of a model pollutant ferulic acid by the endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. *Bioresource Technology* , 179, pp. 35-42.
- Yang, X.-L., Zhang, J.-Z., & Luo, D. Q. (2012). The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. *Natural Product Reports*. 29, pp. 622-641.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., et al. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological research* , 165(6), pp. 437-449.



- Zhang, H. X. (2012). An antimicrobial compound from the endophytic fungus *Phoma* sp. isolated from the medicinal plant *Taraxacum mongolicum*. *Journal of Taiwan in Institute of Chemical Engineers* .
- Zhang, Y., Feng, j., Kang, Y., Zhang, J., Gu, P., Wang, Y., et al. (17 de Abril de 2009). Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. *Marine Drugs* , 7, pp. 97-112.
- .



## Anexos





## 7. ANEXOS

Neste anexo são apresentados os dados experimentais obtidos em algumas das fermentações realizadas neste trabalho experimental

**Tabela 10: Valores obtidos no decorrer da experiência A.**

				Após filtração + 24h de estufa					Filtrado							
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> ) (g/L)	pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	Código		
				filtro	Filtro + bolo	bolo										
1	19-Fev	22-Fev	3	0,0942	0,1566	0,0624	3,1200	3,3933	4,89	0,520 0,556 0,547	1/5	0,541	4711,667	A1		
2	19-Fev	22-Fev	3	0,0946	0,1655	0,0709	3,5450		4,85	0,430 0,443 0,479	1/5	0,451	3958,889	A2		
3	19-Fev	22-Fev	3	0,0953	0,1656	0,0703	3,5150		5,01	0,367 0,348 0,396	1/5	0,370	3289,444	A3		
4	19-Fev	25-Fev	6	0,0941	0,2194	0,1253	6,2650		6,0767	7,56	0,315 0,345 0,350	1	0,337	601,778	A4	
5	19-Fev	25-Fev	6	0,0954	0,2164	0,121	6,0500			8,29	0,321 0,326 0,282	1	0,310	556,778	A5	
6	19-Fev	25-Fev	6	0,0949	0,2132	0,1183	5,9150			8,31	0,336 0,347 0,341	1	0,341	609,556	A6	
7	19-Fev	26-Fev	7	0,0940	0,2221	0,1281	6,4050			6,3517	8,83	0,290 0,321 0,325	1	0,312	560,667	A7
8	19-Fev	26-Fev	7	0,0937	0,2212	0,1275	6,3750				8,73	0,258 0,275 0,292	1	0,275	499,000	A8
9	19-Fev	26-Fev	7	0,0951	0,2206	0,1255	6,2750				8,79	0,282 0,272 0,277	1	0,277	502,333	A9

Tabela 10: Valores obtidos no decorrer da experiência A (continuação).

				Após filtração + 24h de estufa					Filtrado					
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> ) (g/L)	pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	Código
				filtro	filtro + bolo	bolo								
10	19-Fev	27-Fev	8	0,0944	0,2174	0,1230	6,1500	6,1183	8,91	0,275	1	0,292	526,778	A10
										0,302				
										0,298				
11	19-Fev	27-Fev	8	0,0958	0,2188	0,123	6,1500		8,87	0,263	1	0,256	466,778	A11
										0,241				
										0,263				
12	19-Fev	27-Fev	8	0,0940	0,2151	0,1211	6,0550		8,86	0,258	1	0,264	480,667	A12
										0,269				
										0,265				
13	19-Fev	28-Fev	9	0,0933	0,2266	0,1333	6,6650	6,4817	9,02	0,314	1	0,315	566,222	A13
										0,309				
										0,323				
14	19-Fev	28-Fev	9	0,0943	0,2219	0,1276	6,3800		9,05	0,329	1	0,327	585,667	A14
										0,326				
										0,326				
15	19-Fev	28-Fev	9	0,0948	0,2228	0,128	6,4000		9,00	0,248	1	0,257	469,556	A15
										0,259				
										0,265				
16	19-Fev	01-Mar	10	0,0962	0,2345	0,1383	6,9150	6,8333	9,05	0,287	1	0,290	523,444	A16
										0,290				
										0,292				
17	19-Fev	01-Mar	10	0,0955	0,2285	0,1330	6,6500		9,14	0,265	1	0,219	405,111	A17
										0,220				
										0,171				
18	19-Fev	01-Mar	10	0,0947	0,2334	0,1387	6,9350		9,04	0,259	1	0,254	464,000	A18
										0,249				
										0,254				

Tabela 11: Valores obtidos no decorrer da experiência B.

				Após filtração + 24h de estufa					Filtrado					
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> ) (g/L)	pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	Código
				filtro	filtro + bolo	bolo								
1	05-Mar	07-Mar	2	0,0939	0,0973	0,0034	0,1700	0,1725	5,82	0,440 0,480 0,471	1/6	0,464	4880,667	B1
2	05-Mar	07-Mar	2	0,0960	0,0995	0,0035	0,1750		5,49	0,565 0,549 0,554	1/6	0,556	5804,000	B2
3	05-Mar	08-Mar	3	0,0953	0,1156	0,0203	1,0150		0,9725	4,43	0,450 0,537 0,512	1/6	0,500	5240,667
4	05-Mar	08-Mar	3	0,0962	0,1148	0,0186	0,9300	4,09		0,503 0,509 0,515	1/6	0,509	5334,000	B4
5	05-Mar	11-Mar	6	0,0966	0,1476	0,0510	2,5500	2,5025		3,40	0,294 0,285 0,276	1/4	0,285	2062,667
6	05-Mar	11-Mar	6	0,0962	0,1453	0,0491	2,4550		3,47	0,325 0,357 0,365	1/4	0,349	2489,333	B6
7	05-Mar	12-Mar	7	0,0963	0,164	0,0677	3,3850		3,3250	3,46	0,443 0,437 0,448	1	0,443	778,444
8	05-Mar	12-Mar	7	0,0969	0,1622	0,0653	3,2650	3,62		0,024 0,026 0,027	1	0,026	83,444	B8
9	05-Mar	13-Mar	8	0,0971	0,1850	0,0879	4,3950	4,2500		3,40	0,037 0,042 0,035	1	0,038	104,000
10	05-Mar	13-Mar	8	0,0964	0,1785	0,0821	4,1050		3,54	0,035 0,030 0,029	1	0,031	92,889	B10

Tabela 11: Valores obtidos no decorrer da experiência B (continuação).

				Após filtração + 24h de estufa					Filtrado					
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> ) (g/L)	pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	Código
				filtro	filtro + bolo	bolo								
11	05-Mar	14-Mar	9	0,0971	0,1751	0,0780	3,9000	3,7275	3,38	0,047	1	0,042	111,222	B11
										0,039				
										0,041				
12	05-Mar	14-Mar	9	0,0964	0,1675	0,0711	3,5550	3,7275	3,64	0,017	1	0,015	65,667	B12
										0,017				
										0,011				
13	05-Mar	15-Mar	10	0,0951	0,1673	0,0722	3,6100	3,5900	3,60	0,033	1	0,039	105,111	B13
										0,045				
										0,038				
14	05-Mar	15-Mar	10	0,0953	0,1667	0,0714	3,5700	3,5900	3,60	0,041	1	0,034	97,333	B14
										0,037				
										0,024				
15	05-Mar	18-Mar	13	0,0965	0,1709	0,0744	3,7200	3,8425	Evaporado					B15
16	05-Mar	18-Mar	13	0,0949	0,1742	0,0793	3,9650		Evaporado					B16
17	05-Mar	19-Mar	14	0,0938	0,1785	0,0847	4,2350	4,1450	Evaporado					B17
18	05-Mar	19-Mar	14	0,0957	0,1768	0,0811	4,0550		Evaporado					B18



Tabela 12: Valores obtidos no decorrer da experiência C.

				Após filtração + 24h de estufa					Filtrado					
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> ) (g/L)	pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	Código
				filtro	filtro + bolo	bolo								
1	19-Mar	20-Mar	1	0,0954	0,1006	0,0052	0,2600	0,2225	5,72	0,315 0,329 0,301	1/5	0,315	2828,333	C1
2	19-Mar	20-Mar	1	0,0944	0,0981	0,0037	0,1850		6,19	0,321 0,341 0,316	1/5	0,326	2920,000	C2
3	19-Mar	21-Mar	2	0,0953	0,1053	0,0100	0,5000		0,5000	5,54	0,319 0,336 0,309	1/5	0,321	2881,111
4	19-Mar	21-Mar	2	0,0945	0,1045	0,0100	0,5000	5,47		0,301 0,312 0,262	1/5	0,292	2633,889	C4
5	19-Mar	22-Mar	3	0,0971	0,1307	0,0336	1,6800	1,7150		3,60	0,239 0,239 0,228	1/5	0,235	2164,444
6	19-Mar	22-Mar	3	0,0956	0,1306	0,0350	1,7500		3,40	0,292 0,208 0,238	1/5	0,246	2253,333	C6
7	19-Mar	25-Mar	6	0,0978	0,1805	0,0827	4,1350		4,1450	3,28	0,117 0,112 0,115	1	0,115	231,778
8	19-Mar	25-Mar	6	0,0965	0,1796	0,0831	4,1550	3,25		0,093 0,091 0,098	1	0,094	197,333	C8
9	19-Mar	26-Mar	7	0,0946	0,1672	0,0726	3,6300	4,2250		3,33	0,052 0,059 0,058	1	0,056	134,556
10	19-Mar	26-Mar	7	0,0952	0,1916	0,0964	4,8200		3,26	0,049 0,051 0,044	1	0,048	120,667	C10

Tabela 12: Valores obtidos no decorrer da experiência C (continuação).

					Após filtração + 24h de estufa				Filtrado					
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> )	pH	Leitura absorvâncias	Diluição	Média Abs	Concentração filtrado AR	Código
				filtro	filtro +	bolo								
11	19-Mar	27-Mar	8	0,0964	0,1556	0,0592	2,9600	3,2550	3,22	0,052	1	0,052	127,889	C11
										0,050				
										0,055				
12	19-Mar	27-Mar	8	0,0953	0,1663	0,0710	3,5500		3,21	0,064	1	0,060	141,222	C12
										0,058				
										0,059				
13	19-Mar	28-Mar	9	0,0963	0,1755	0,0792	3,9600	3,6500	3,15	0,054	1	0,053	128,444	C13
										0,052				
										0,052				
14	19-Mar	28-Mar	9	0,0973	0,1641	0,0668	3,3400		3,27	0,071	1	0,064	147,333	C14
										0,060				
										0,061				
15	19-Mar	01-Abr	13	0,0986	0,1499	0,0513	2,5650	3,2675	3,16	0,058	1	0,054	131,222	C15
										0,053				
										0,052				
16	19-Mar	01-Abr	13	0,0969	0,1763	0,0794	3,9700		3,36	0,034	1	0,033	96,222	C16
										0,032				
										0,034				
17	19-Mar	02-Abr	14	0,0952	0,1663	0,0711	3,5550	3,3075	3,17	0,037	1	0,04	103,444	C17
										0,037				
										0,039				
18	19-Mar	02-Abr	14	0,0963	0,1575	0,0612	3,0600		3,28	0,027	1	0,03	92,889	C18
										0,032				
										0,035				

Tabela 13: Valores obtidos no decorrer da experiência D.

				Após filtração + 24h de estufa					Filtrado					
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> ) (g/L)	pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	Código
				filtro	filtro + bolo	bolo								
1	05-Abr	08-Abr	3	0,0960	0,1120	0,0160	0,8000	1,0700	3,66	0,519 0,487 0,519	1/6	0,508	5327,333	D1
2	05-Abr	08-Abr	3	0,0971	0,1239	0,0268	1,3400		3,61	0,516 0,526 0,523	1/6	0,522	5460,667	D2
3	05-Abr	09-Abr	4	0,0948	0,1432	0,0484	2,4200		2,2850	3,47	0,335 0,336 0,340	1/6	0,337	3614,000
4	05-Abr	09-Abr	4	0,0940	0,1370	0,0430	2,1500	3,48		0,453 0,487 0,496	1/5	0,479	4192,222	D4
5	05-Abr	10-Abr	5	0,0949	0,1565	0,0616	3,0800	2,7125		3,49	0,229 0,237 0,226	1/4	0,231	1700,444
6	05-Abr	10-Abr	5	0,0959	0,1428	0,0469	2,3450		3,43	0,421 0,422 0,422	1/2	0,422	1486,889	D6
7	05-Abr	11-Abr	6	0,0953	0,1432	0,0479	2,3950		2,6000	3,30	0,345 0,346 0,352	1/2	0,348	1240,222
8	05-Abr	11-Abr	6	0,0964	0,1525	0,0561	2,8050	3,61		0,421 0,422 0,422	1	0,422	743,444	D8
9	05-Abr	12-Abr	7	0,0950	0,1589	0,0639	3,1950	3,9900		3,43	0,333 0,325 0,330	1	0,329	589,556
10	05-Abr	12-Abr	7	0,0950	0,1907	0,0957	4,7850		3,46	0,169 0,172 0,177	1	0,173	328,444	D10

Tabela 13: Valores obtidos no decorrer da experiência D (continuação).

				Após filtração + 24h de estufa					Filtrado					
Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	Massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média (X <sub>média</sub> ) (g/L)	pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	Código
				filtro	filtro + bolo	bolo								
11	05-Abr	15-Abr	10	0,0952	0,1651	0,0699	3,4950	3,9775	3,46	0,050	1	0,045	115,667	D11
										0,042				
										0,043				
12	05-Abr	15-Abr	10	0,0954	0,1846	0,0892	4,4600		3,48	0,046	1	0,042	110,111	D12
										0,040				
										0,039				
13	05-Abr	16-Abr	11	0,0967	0,1531	0,0564	2,8200	3,2850	3,56	0,035	1	0,036	100,111	D13
										0,038				
										0,034				
14	05-Abr	16-Abr	11	0,0932	0,1682	0,0750	3,7500		3,45	0,045	1	0,046	117,333	D14
										0,050				
										0,043				
15	05-Abr	17-Abr	12	0,0971	0,1578	0,0607	3,0350	3,0775	3,68	0,034	1	0,032	93,444	D15
										0,031				
										0,030				
16	05-Abr	17-Abr	12	0,0958	0,1582	0,0624	3,1200		3,49	0,058	1	0,050	124,000	D16
										0,045				
										0,047				
17	05-Abr	18-Abr	13	0,0959	0,1491	0,0532	2,6600	2,4400	3,54	0,048	1	0,048	120,667	D17
										0,047				
										0,049				
18	05-Abr	18-Abr	13	0,0961	0,1405	0,0444	2,2200		3,60	0,047	1	0	121,222	D18
										0,050				
										0,048				

**-Desenho experimental****Tabela 14: Resultados referentes à experiência D30.2 e D30.3.**

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
<b>D30.2</b>	1	02 Ago	16 Ago	14	0,0951	0,2471	0,1520	4,5500	5,1638	3,52	0,512 0,454 0,425	1/10	0,464	8134,444	D30.2.1
	2	02 Ago	16 Ago	14	0,0955	0,3266	0,2311	5,7775		3,41	0,432 0,396 0,416	1/10	0,415	7317,778	D30.2.2
	3	02 Ago	26 Ago	24	0,0949	0,3544	0,2595	6,4875	5,5525	3,19	0,365 0,438 0,325	1/19	0,376	12679,333	D30.2.3
	4	02 Ago	26 Ago	24	0,0946	0,2793	0,1847	4,6175		3,28	0,456 0,445 0,497	1/19	0,466	15529,333	D30.2.4
	5	02 Ago	30 Ago	28	0,0939	0,3387	0,2448	6,1200	5,9525	3,37	0,331 0,320 0,320	1	0,324	580,111	D30.2.5
	6	02 Ago	30 Ago	28	0,0966	0,3296	0,2330	5,8250		3,31	0,099 0,104 0,103	1	0,102	210,667	D30.2.6
	1	02 Ago	16 Ago	14	0,0950	0,1733	0,0783	1,9575	1,9313	5,45	0,335 0,324 0,332	1	0,330	591,222	D30.3.1
	2	02 Ago	16 Ago	14	0,0942	0,1704	0,0762	1,9050		5,02	0,352 0,349 0,349	1	0,350	624,000	D30.3.2
<b>D30.3</b>	3	02 Ago	26 Ago	24	0,0953	0,1838	0,0885	2,2125	2,4200	4,94	0,222 0,209 0,203	1	0,211	392,889	D30.3.3
	4	02 Ago	26 Ago	24	0,0954	0,2005	0,1051	2,6275		5,77	0,163 0,162 0,161	1	0,162	310,667	D30.3.4
	5	02 Ago	30 Ago	28	0,0962	0,1900	0,0938	2,3450	2,5288	5,65	0,222 0,213 0,212	1	0,216	400,111	D30.3.5
	6	02 Ago	30 Ago	28	0,0948	0,2033	0,1085	2,7125		5,94	0,070 0,078 0,074	1	0,074	164,000	D30.3.6

Tabela 15: Resultados referentes à experiência D30.4 e D30.5.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D30.4	1	02 Ago	16 Ago	14	0,0935	0,1553	0,0618	1,5450	1,9438	4,25	0,309 0,374 0,386	1/19	0,356	12056,556	D30.4.1
	2	02 Ago	16 Ago	14	0,0956	0,1893	0,0937	2,3425		4,87	0,508 0,514 0,534	1/19	0,519	17197,111	D30.4.2
	3	02 Ago	26 Ago	24	0,0948	0,3076	0,2128	5,3200	4,9013	4,60	0,571 0,572 0,566	1/10	0,570	9901,111	D30.4.3
	4	02 Ago	26 Ago	24	0,0963	0,2756	0,1793	4,4825		4,79	0,564 0,488 0,534	1/10	0,529	9217,778	D30.4.4
	5	02 Ago	30 Ago	28	0,0958	0,2848	0,1890	4,7250	4,3288	4,95	0,495 0,479 0,454	1/10	0,476	8340,000	D30.4.5
	6	02 Ago	30 Ago	28	0,0952	0,2525	0,1573	3,9325		4,62	0,327 0,346 0,420	1/19	0,364	12309,889	D30.4.6
D30.5	1	02 Ago	16 Ago	14	0,0959	0,1852	0,0893	2,2325	2,2463	3,32	0,436 0,428 0,398	1/10	0,421	7417,778	D30.5.1
	2	02 Ago	16 Ago	14	0,0957	0,1861	0,0904	2,2600		3,34	0,350 0,363 0,394	1/10	0,369	6556,667	D30.5.2
	3	02 Ago	26 Ago	24	0,0957	0,2755	0,1798	4,4950	4,2013	3,37	0,017 0,021 0,048	1/10	0,029	884,444	D30.5.3
	4	02 Ago	26 Ago	24	0,0966	0,2529	0,1563	3,9075		3,34	0,182 0,157 0,165	1	0,168	320,667	D30.5.4
	5	02 Ago	30 Ago	28	0,0966	0,3039	0,2073	5,1825	4,8788	3,28	0,181 0,185 0,187	1	0,184	347,889	D30.5.5
	6	02 Ago	30 Ago	28	0,0932	0,2762	0,1830	4,5750		3,32	0,092 0,097 0,102	1	0,097	202,333	D30.5.6

Tabela 16: Resultados referentes à experiência D30.6 e D30.7.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D30.6	1	02 Ago	16 Ago	14	0,0959	0,2098	0,1139	2,8475	3,9675	3,30	0,435 0,423 0,398	1/19	0,419	14030,444	D30.6.1
	2	02 Ago	16 Ago	14	0,0943	0,2978	0,2035	5,0875		3,26	0,356 0,464 0,440	1/19	0,420	14072,667	D30.6.2
	3	02 Ago	26 Ago	24	0,0955	0,3595	0,2640	6,6000	5,9800	3,31	0,279 0,288 0,298	1/19	0,288	9903,222	D30.6.3
	4	02 Ago	26 Ago	24	0,0956	0,3100	0,2144	5,3600		3,21	0,431 0,448 0,427	1/19	0,435	14558,222	D30.6.4
	5	02 Ago	30 Ago	28	0,0926	0,3250	0,2324	5,8100	6,6713	3,24	0,495 0,474 0,489	1/10	0,486	8506,667	D30.6.5
	6	02 Ago	30 Ago	28	0,0964	0,3977	0,3013	7,5325		3,29	0,357 0,378 0,379	1/19	0,371	12531,556	D30.6.6
D30.7	1	27-Ago	10-Set	14	0,0972	0,1707	0,0735	1,8375	1,9238	6,66	0,507 0,495 0,541	1	0,514	897,889	D30.7.1
	2	27-Ago	10-Set	14	0,0967	0,1771	0,0804	2,0100		5,37	0,362 0,353 0,359	1	0,358	637,333	D30.7.2
	3	27-Ago	20-Set	24	0,0943	0,2301	0,1358	3,3950	3,7650	4,81	0,233 0,237 0,240	1	0,237	435,111	D30.7.3
	4	27-Ago	20-Set	24	0,0966	0,2620	0,1654	4,1350		5,07	0,349 0,327 0,327	1	0,334	597,889	D30.7.4
	5	27-Ago	24-Set	28	0,0973	0,2741	0,1768	4,4200	3,0888	4,99	0,178 0,187 0,214	1	0,193	362,333	D30.7.5
	6	27-Ago	24-Set	28	0,0952	0,1655	0,0703	1,7575		4,79	0,130 0,127 0,134	1	0,130	257,889	D30.7.6

Tabela 17: Resultados referentes à experiência D30.8 e D20.1.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{média}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D30.8	1	25-Out	08-Nov	14	0,0943	0,1889	0,0946	2,3650	2,3800	4,19	0,435	1/19	0,422	14146,556	D30.8.1
											0,434				
											0,398				
	2	25-Out	08-Nov	14	0,0948	0,1906	0,0958	2,3950	2,3800	4,67	0,356	1/19	0,417	13977,667	D30.8.2
											0,454				
											0,441				
	3	25-Out	18-Nov	24	0,0946	0,3407	0,2461	6,1525	5,9763	4,34	0,274	1/19	0,277	9533,778	D30.8.3
											0,258				
											0,298				
	4	25-Out	18-Nov	24	0,0950	0,3270	0,2320	5,8000	5,9763	4,57	0,411	1/19	0,429	14357,667	D30.8.4
											0,449				
											0,427				
	5	25-Out	22-Nov	28	0,0959	0,2423	0,1464	3,6600	4,3625	4,86	0,485	1/10	0,482	8440,000	D30.8.5
											0,471				
											0,490				
D20.1	6	25-Out	22-Nov	28	0,0957	0,2983	0,2026	5,0650	4,3625	4,39	0,353	1/19	0,364	12309,889	D30.8.6
											0,368				
											0,372				
	1	30-Ago	13-Set	14	0,0951	0,2107	0,1156	2,8900	2,6425	3,32	0,492	1	0,482	844,556	D20.1.1
											0,477				
											0,478				
	2	30-Ago	13-Set	14	0,0948	0,1906	0,0958	2,3950	2,6425	3,32	0,129	1	0,123	245,111	D20.1.2
											0,120				
											0,119				
	3	30-Ago	23-Set	24	0,0951	0,2224	0,1273	3,1825	3,2475	3,35	0,058	1	0,058	137,333	D20.1.3
											0,058				
											0,058				
	4	30-Ago	23-Set	24	0,0962	0,2287	0,1325	3,3125	3,2475	3,43	0,048	1	0,050	123,444	D20.1.4
											0,051				
											0,050				
	5	30-Ago	27-Set	28	0,0961	0,2150	0,1189	2,9725	2,5850	3,39	0,085	1	0,051	126,222	D20.1.5
											0,034				
											0,035				
	6	30-Ago	27-Set	28	0,0977	0,1856	0,0879	2,1975	2,5850	3,35	0,052	1	0,046	117,889	D20.1.6
											0,039				
											0,048				



Tabela 18: Resultados referentes à experiência D20.2 e D20.3.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D20.2	1	30-Ago	13-Set	14	0,0942	0,1972	0,1030	2,5750	2,4750	3,32	0,132 0,123 0,124	1/99	0,126	24871,000	D20.2.1
	2	30-Ago	13-Set	14	0,0962	0,1912	0,0950	2,3750		3,35	0,096 0,111 0,113	1/99	0,107	21626,000	D20.2.2
	3	30-Ago	23-Set	24	0,0968	0,2544	0,1576	3,9400	3,6838	3,34	0,504 0,527 0,573	1/19	0,535	17703,778	D20.2.3
	4	30-Ago	23-Set	24	0,0942	0,2313	0,1371	3,4275		3,31	0,544 0,549 0,527	1/19	0,540	17872,667	D20.2.4
	5	30-Ago	27-Set	28	0,0966	0,2165	0,1199	2,9975	3,8913	3,35	0,440 0,484 0,444	1	0,456	800,667	D20.2.5
	6	30-Ago	27-Set	28	0,0946	0,2860	0,1914	4,7850		3,76	0,264 0,248 0,249	1	0,254	463,444	D20.2.6
D20.3	1	30-Ago	13-Set	14	0,0968	0,2113	0,1145	2,8625	2,7975	4,30	0,125 0,130 0,135	1	0,130	257,333	D20.3.1
	2	30-Ago	13-Set	14	0,0954	0,2047	0,1093	2,7325		4,62	0,127 0,127 0,125	1	0,126	251,222	D20.3.2
	3	30-Ago	23-Set	24	0,0949	0,1942	0,0993	2,4825	2,6638	4,82	0,445 0,458 0,466	1	0,456	801,222	D20.3.3
	4	30-Ago	23-Set	24	0,0943	0,2081	0,1138	2,8450		4,19	0,402 0,414 0,412	1	0,409	722,889	D20.3.4
	5	30-Ago	27-Set	28	0,0953	0,2014	0,1061	2,6525	2,4250	4,33	0,480 0,487 0,504	1	0,490	857,889	D20.3.5
	6	30-Ago	27-Set	28	0,0958	0,1837	0,0879	2,1975		5,10	0,291 0,277 0,272	1	0,280	507,333	D20.3.6

Tabela 19: Resultados referentes à experiência D20.4 e D20.5.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D20.4	1	30-Ago	13-Set	14	0,0964	0,1626	0,0662	1,6550	1,8575	4,35	0,321 0,300 0,403	1/49	0,341	29868,222	D20.4.1
	2	30-Ago	13-Set	14	0,0962	0,1786	0,0824	2,0600		4,47	0,359 0,447 0,435	1/49	0,414	35775,444	D20.4.2
	3	30-Ago	23-Set	24	0,0954	0,2216	0,1262	3,1550	3,4988	4,45	0,161 0,206 0,161	1/49	0,176	16366,000	D20.4.3
	4	30-Ago	23-Set	24	0,0966	0,2503	0,1537	3,8425		4,86	0,157 0,153 0,149	1/49	0,153	14487,667	D20.4.4
	5	30-Ago	27-Set	28	0,0963	0,2540	0,1577	3,9425	3,8825	5,20	0,315 0,324 0,348	1/25	0,329	14725,000	D20.4.5
	6	30-Ago	27-Set	28	0,0949	0,2478	0,1529	3,8225		4,79	0,358 0,369 0,333	1/25	0,353	15738,889	D20.4.6
D20.5	1	01-Out	15-Out	14	0,0948	0,2066	0,1118	2,7950	3,1675	3,31	0,025 0,045 0,033	1	0,034	97,889	D20.5.1
	2	01-Out	15-Out	14	0,0955	0,2371	0,1416	3,5400		3,34	0,015 0,012 0,017	1	0,015	65,111	D20.5.2
	3	01-Out	25-Out	24	0,0945	0,2071	0,1126	2,8150	2,8238	3,87	0,089 0,090 0,097	1	0,092	194,000	D20.5.3
	4	01-Out	25-Out	24	0,0945	0,2078	0,1133	2,8325		4,25	0,090 0,092 0,087	1	0,090	190,111	D20.5.4
	5	01-Out	29-Out	28	0,0950	0,2082	0,1132	2,8300	2,6600	3,95	0,067 0,068 0,074	1	0,070	156,778	D20.5.5
	6	01-Out	29-Out	28	0,0962	0,1958	0,0996	2,4900		4,07	0,079 0,075 0,075	1	0,076	167,889	D20.5.6

Tabela 20: Resultados referentes à experiência D20.6 e D20.7.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D20.6	1	01-Out	15-Out	14	0,0949	0,3732	0,2783	6,9575	6,3188	3,27	0,174 0,159 0,109	1/99	0,147	28336,000	D20.6.1
	2	01-Out	15-Out	14	0,0966	0,3238	0,2272	5,6800		3,22	0,179 0,265 0,164	1/99	0,203	37466,000	D20.6.2
	3	01-Out	25-Out	24	0,0947	0,2857	0,1910	4,7750	4,6100	3,42	0,110 0,124 0,105	1/49	0,113	11221,000	D20.6.3
	4	01-Out	25-Out	24	0,0948	0,2726	0,1778	4,4450		3,72	0,195 0,166 0,202	1/49	0,188	17318,778	D20.6.4
	5	01-Out	29-Out	28	—	—	—	—	4,4575	—	— — —	—	—	—	D20.6.5
	6	01-Out	29-Out	28	0,0934	0,2717	0,1783	4,4575		3,75	0,184 0,192 0,208	1/19	0,195	6937,111	D20.6.6
D20.7	1	01-Out	15-Out	14	0,0952	0,2425	0,1473	3,6825	3,1975	6,29	0,043 0,043 0,039	1	0,042	110,111	D20.7.1
	2	01-Out	15-Out	14	0,0955	0,2040	0,1085	2,7125		5,86	0,368 0,354 0,648	1	0,457	801,778	D20.7.2
	3	01-Out	25-Out	24	0,0957	0,1912	0,0955	2,3875	2,3863	5,94	0,093 0,075 0,090	1	0,086	184,000	D20.7.3
	4	01-Out	25-Out	24	0,0954	0,1908	0,0954	2,3850		5,24	0,492 0,482 0,562	1	0,512	894,000	D20.7.4
	5	01-Out	29-Out	28	0,0942	0,1874	0,0932	2,3300	2,3588	6,38	0,028 0,034 0,039	1	0,034	96,778	D20.7.5
	6	01-Out	29-Out	28	0,0944	0,1899	0,0955	2,3875		5,07	0,475 0,489 0,477	1	0,480	841,222	D20.7.6

Tabela 21: Resultados referentes à experiência D20.8 e D25.4.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D20.8	1	01-Out	15-Out	14	0,0964	0,2657	0,1693	4,2325	4,3775	4,73	0,177	1/49	0,205	18707,111	D20.8.1
											0,204				
											0,233				
	2	01-Out	15-Out	14	0,0953	0,2762	0,1809	4,5225	4,3775	5,35	0,247	1/49	0,216	19632,667	D20.8.2
											0,195				
											0,206				
	3	01-Out	25-Out	24	0,0951	0,2940	0,1989	4,9725	5,6225	4,16	0,102	1/49	0,101	10213,778	D20.8.3
											0,089				
											0,111				
	4	01-Out	25-Out	24	0,0947	0,3456	0,2509	6,2725	5,6225	4,44	0,058	1/49	0,063	7164,889	D20.8.4
											0,072				
											0,060				
	5	01-Out	29-Out	28	0,0938	0,3456	0,2518	6,2950	6,1625	4,61	0,123	1/19	0,126	4762,667	D20.8.5
											0,136				
											0,119				
D25.4	1	02-Ago	16-Ago	14	0,0937	0,3245	0,2308	5,7700	5,1525	3,77	0,338	1	0,324	580,111	D25.4.1
											0,322				
											0,311				
	2	02-Ago	16-Ago	14	0,0955	0,2769	0,1814	4,5350	5,1525	3,62	0,186	1	0,196	367,889	D25.4.2
											0,212				
											0,191				
	3	02-Ago	26-Ago	24	0,0947	0,3004	0,2057	5,1425	5,2988	3,73	0,075	1	0,073	162,889	D25.4.3
											0,071				
											0,074				
	4	02-Ago	26-Ago	24	0,0943	0,3125	0,2182	5,4550	5,2988	3,81	0,048	1	0,048	121,222	D25.4.4
											0,052				
											0,045				
	5	02-Ago	30-Ago	28	0,0957	0,2368	0,1411	3,5275	3,2425	3,68	0,228	1	0,226	417,889	D25.4.5
											0,222				
											0,229				
	6	02-Ago	30-Ago	28	0,0954	0,2137	0,1183	2,9575	3,2425	3,75	0,220	1	0,214	396,778	D25.4.6
											0,215				
											0,206				

Tabela 22: Resultados referentes à experiência D25.1 e D25.3.

	Amostra	Data início	Data filtração	Tempo cumulativo (dias)	massa (g)			Concentração (X) (g/L)	Concentração média ( $X_{\text{média}}$ ) (g/L)	Filtrado					Código
					filtro	filtro + bolo	bolo			pH	Leitura absorvâncias (540 nm)	Diluição	Média Abs (540 nm)	Concentração filtrado AR (mg/L)	
D25.1	1	14-Jul	21-Jul	7	0,0970	0,2457	0,1487	3,7175	3,8138	6,76	0,210 0,205 0,206	1	0,207	385,667	D25.1.1
	2	14-Jul	21-Jul	7	0,0949	0,2513	0,1564	3,9100		7,04	0,163 0,160 0,160	1	0,161	309,000	D25.1.2
	3	14-Jul	28-Jul	14	0,0958	0,2243	0,1285	3,2125	3,0450	7,09	0,053 0,049 0,046	1	0,049	122,889	D25.1.3
	4	14-Jul	28-Jul	14	0,0955	0,2106	0,1151	2,8775		7,58	0,038 0,042 0,048	1	0,043	111,778	D25.1.4
D25.3	1	14-Jul	21-Jul	7	0,0972	0,2498	0,1526	3,8150	3,8888	3,53	0,429 0,427 0,437	1	0,431	759,000	D25.3.1
	2	14-Jul	21-Jul	7	0,0959	0,2544	0,1585	3,9625		3,54	0,379 0,385 0,394	1	0,386	684,000	D25.3.2
	3	14-Jul	28-Jul	14	0,0956	0,2812	0,1856	4,6400	4,4800	3,52	0,304 0,307 0,313	1	0,308	554,000	D25.3.3
	4	14-Jul	28-Jul	14	0,0939	0,2667	0,1728	4,3200		3,57	0,339 0,336 0,353	1	0,343	611,778	D25.3.4